

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Helena Kopřivová

Dynamika tvorby T regulačních lymfocytů během těhotenství
The dynamics of T regulatory lymphocytes generation during pregnancy

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:

RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Externí konzultant:

MUDr. Karin Malíčková

Praha 2017

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8.4.2017

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych ráda poděkovala RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. z Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy a MUDr. Karin Malíčkové z imunologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za vedení mé diplomové práce. Byly mojí velkou oporou při psaní diplomové práce a pomohly mně nejen odbornou konzultací, ale i osobním přístupem. Velké poděkování patří Ing. Miroslavu Hindošovi z imunologické laboratoře Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, který byl mým průvodcem průtokovou cytometrií.

Poděkování patří také MUDr. Michalu Kouckému Ph.D. z Gynekologicko-porodnické kliniky Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy za neoblomnou snahu prosadit imunologické parametry v diagnostice těhotenských komplikací a za odbornou konzultaci v oblasti gynekologie a porodnictví, a všem ženám, které byly ochotny se studie účastnit. V neposlední řadě chci touto cestou poděkovat své rodině, která byla po celou dobu studia mojí velkou oporou.

Abstrakt

T regulační lymfocyty (Treg) jsou populací $CD4^+$ lymfocytů s regulačními a reparačními vlastnostmi. Treg jsou funkčně i diferenciacně kontrolovány transkripčním faktorem Foxp3. Tato populace je považována za klíčovou pro navození fetomaternální tolerance. Narušení tohoto unikátního typu časově omezené imunitní tolerance vede ke vzniku těhotenských komplikací, jakými jsou infertilita, růstové retardace plodu nebo předčasný porod. Indukce tvorby Treg je ovlivněna cytokinovým prostředím, zejména TGF- β , IL-2 a kyseliny retinové. Tento pleiotropní cytokin se podílí na diferenciaci tolerogenních populací deciduálních buněk.

V předkládané práci jsme provedli podrobnou imunofenotypizaci Treg a stanovení sérových koncentrací TGF- β 1 v průběhu fyziologického těhotenství. Sledované subpopulace exprimovaly znaky různého stupně funkční i maturační vyzrálosti Treg. U některých subpopulací došlo v průběhu těhotenství ke změnám dynamiky jejich tvorby. Obdobná tendence se objevila i u sérové koncentrace TGF- β 1.

Část práce byla věnována sledování stejných parametrů ve skupině předčasně rodících žen s cílem vytipovat vhodný biomarker hrozícího předčasného porodu. Dle předpokladů bylo u předčasně rodících žen snižené zastoupení populace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$. Jako další možný cíl výzkumu biomarkerů hrozícího porodu by se mohla stát subpopulace Treg s expresí aktivačního znaku GARP a analýza cytokinového prostředí.

Abstract

Regulatory T cells (Tregs) are CD 4⁺ T lymphocytes with regulatory and reparative properties. Tregs are functionally and differentially controlled by Foxp3 transcription factor, and they are considered a key factor inducing feto-maternal tolerance. Disruption of this unique type of time-limited immune tolerance leads to pregnancy complications including miscarriages, intrauterine growth retardation of the fetus, and premature delivery. Tregs' production and functional properties are influenced by the cytokine environment, especially by TGF-β1, IL-2, and retinoic acid. These pleiotropic factors are involved in the differentiation of tolerogenic populations of decidual cells.

In the present work, a detailed immunophenotyping of Tregs was performed, and a determination of serum concentrations of TGF-β1 during physiological pregnancy was realized. The examined subpopulations of Tregs have shown different signs or markers of their functional and maturity properties. In some subpopulations, apparent changes in Treg counts were observed during pregnancy. Moreover, typical development was observed for TGF-β1 serum levels.

The main goal of the current work was an examination of differences in Treg subpopulation counts in women with premature deliveries compared to females with full term births. physiological pregnancies. In premature deliveries, reduced counts of CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺ Tregs were demonstrated. In future, GARP activation marker expression, other phenotypic markers, and cytokine levels during pregnancy could be potential targets of research.

Obsah

Poděkování	3
Abstrakt	4
Abstract	5
Obsah.....	6
Seznam zkratek.....	8
Teoretická část	10
1 Úvod	10
2 Těhotenství a imunita.....	11
2.1 Imunita a menstruační cyklus.....	12
2.2 Imunologie implantace.....	13
2.3 Navození fetomaternální tolerance	15
3 Těhotenství a imunitní systém	19
3.1 Deciduální makrofágy.....	19
3.2 Deciduální dendritické buňky.....	20
3.3 Neutrofilní granulocyty	20
3.4 Deciduální NK buňky.....	20
3.5 Ostatní složky imunity a těhotenství	21
3.6 Buněčné složky adaptivní imunitní imunity a těhotenství	21
3.6.1 Th1/Th2/Th17/Treg paradigma v těhotenství.....	22
4 T regulační lymfocyty	24
4.1 Obecná charakteristika populace T regulačních lymfocytů	25
4.2 Mechanismus regulace zprostředkované T regulačními lymfocyty	27
4.3 Regulace zprostředkovaná cytokinovým prostředím.....	28
4.4 Suprese cytolýzou.....	29
4.5 Suprese zprostředkovaná modulací zranění a funkce dendritických buněk	30
4.6 Diferenciační znaky T regulačních lymfocytů	30
Experimentální část	35
5 Cíle diplomové práce	35
6 Použité metody	36
6.1 Princip metody ELISA.....	36
6.1.1 Stanovení TGF- β 1 v experimentu	36
6.2 Princip průtoková cytometrie.....	39

6.2.1	Použití průtokové cytometrie v experimentu	41
7	Analýza výsledků	46
7.1	Charakteristika vyšetřovaných skupin žen	46
7.2	Statistické zhodnocení dat	47
8	Výsledky experimentu	48
8.1	Optimální značení T regulačních lymfocytů v klinické praxi.....	48
8.2	Dynamika tvorby subpopulací T regulačních lymfocytů a TGF- β 1 v těhotenství	49
8.3	Subpopulace T regulačních lymfocytů a sérový TGF- β 1 u předčasně rodících žen.....	57
9	Diskuze.....	63
10	Závěr	67
11	Dodatek	68
12	Obrazové přílohy	71
13	Tabulkové přílohy	72
14	Seznam grafů	72
15	Literatura	74

Seznam zkratek

ADP	Adenosine diphosphate
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen presenting cells
ATP	Adenosine triphosphate
ATP	Adenosine diphosphate
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CCR	Chemokine receptor
CTLA4	Cytotoxic T lymphocyte antigen 4
DC	Dendritic cells
DC	Dendritic cells
dDC	Decidual Dendritic cells
dMac	Decidual macrophages
dNK	Decidua Natural Killer
EVT	Extravillous trophoblasts
Foxp3	Forkhead box P3
FUT 1	Fucosyltransferase 1
FUT 2	Fucosyltransferase 2
GARP	Glycoprotein A repetitions predominant
GITR	Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
hCG	Human chorionic gonadotropin
HLA	Human leukocyte antigen
ICOS	Inducible T cell co-stimulator
IDO	Indoleamine 2,3-dioxygenase
IFN-γ	Interferon γ
IL	Interleukin
IPEX	Immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome
iTreg	„induced“ regulatory T cells
KIR	Killer immunoglobulin-like receptor
LAP	Latency-associated peptide
LCA	leukocyte common antigen
LIF	Leukemia inhibitory factor
LLRC3	Leucine rich repeat containing 3
LTBP	Large Latent Complex
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MHC II	Major histocompatibility complex
NFAR	nukleární faktor aktivovaných T lymfocytů
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NK	Natural Killer
nTreg	„natural“ regulatory T cells

PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PD-L2	Programmed death-ligand 2
PE	Pre-eclampsia
PGE 2	Prostaglandin 2
PIGF	Placental growth factor
PTP	Protein tyrosine phosphatase
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type C
SLC	Small Latent Complex
SLPI	Secretory leukocyte protease inhibitor
STAT5	Signal transducer and activator of transcription 5
TCR	T-cell receptor
TGF-β	Transforming growth factor β
Th1	T helper cells 1
Th2	T helper cells 2
TNF-β	Tumor Necrosis Factor β
Treg	Regulatory T cell
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
VT	Villous trophoblast

Pozn.: Vzhledem k faktu, že většina zkratk je odvozena z anglických názvů, které nemají zažitý český ekvivalent, je seznam zkratk uveden v anglickém jazyce.

Teoretická část

1 Úvod

Těhotenství je přirozený evolučně zakotvený proces nezbytný pro zachování lidského druhu. Výzkum mechanismů vedoucích k úspěšné fertilizaci, nidaci, samotný vývoj plodu, nastavení unikátní tolerance nebo vytvoření komunikační a transportní sítě mezi matkou a jejím plodem je předmětem mnoha výzkumných prací. Vzhledem k tomu, že celý děj probíhá v izolovaném mikroprostředí deciduy, je výzkum lidského těhotenství komplikovaný. Zcela legitimním důvodem omezení jeho výzkumu je i etické hledisko. Častým cílem klinického výzkumu je snaha o zmapování mechanismů spojených s vývojem nového jedince, které by vedly zejména k lepšímu pochopení jednotlivých procesů a přispěly též k časně identifikaci těhotenských komplikací. Nalezení predikčních markerů patologické gravidity by v praxi umožňovalo v odůvodněných případech optimální nastavení léčebných postupů ve prospěch ochrany zdraví matky i dítěte.

Po dlouhá desetiletí byl vliv imunitního systému na průběh těhotenství opomíjen. Těhotenství je pro matčin imunitní systém výzvou a musí od základu změnit principy svého fungování s cílem navodit toleranci semialogenního plodu a současně neztratit schopnost reagovat na působení patogenních agens. Imunita se podílí na všech klíčových dějích spojenými s těhotenstvím a to od samotného vývoje a funkce zárodečných buněk, toleranci spermií matčiným imunitním systémem, proces fertilizace, založený na spojení adhezních molekul na obou zárodečných buňkách, implantaci embrya, angiogenezi spirálních tepen nebo porod plodu probíhající v důsledku přísně regulovaných zánětlivých procesů. Deciduální imunokompetentní buňky mají svůj unikátní tolerogenní fenotyp a jejich cílená migrace je založena zejména na chemotaktickém působení steroidních hormonů produkovaných v decidui.

Jedním z ostře sledovaných parametrů je populace $CD4^+$ Treg (Treg-Regulatory T cell). Tato populace se charakterem své funkce podílí nastolením fetomaternální tolerance, jejíž porušení může být důvodem indukce řady těhotenských komplikací, jakým je například spontánní předčasný porod. Základním induktorem patogeneze spontánního předčasného

porodu je zánět, který je společným jmenovatelem indukce přirozeného porodu v termínu i předčasného spontánního porodu. U obou typů porodů probíhají obdobné pochody na úrovni dělohy, rozdílný je způsob jejich aktivace. U termínového porodu se jedná o fyziologicky probíhající aktivaci, u předčasných porodů jde o aktivaci patologickou. Po aktivaci předčasného i termínového porodu tedy následuje společná dráha, která s sebou nese anatomické, biochemické, imunologické, endokrinologické a klinické jevy, vyskytující se na straně matky i na straně plodu.

Riziko předčasného spontánního porodu je nyní hodnoceno především na podkladě relativně nespecifických epidemiologických faktorů na straně matky. Tyto rizikové faktory hrají nadále důležitou roli, ovšem předpokládá se, že vznik zánětu v období před 34. týdnem těhotenství má své základy již v raných fázích těhotenství. Jeden z důležitých faktorů indukce patologického zánětu může být i narušení fetomaternální tolerance. Probíhá intenzivní studium predikčních biomarkerů předčasného porodu spojených s narušenou fetomaternální tolerancí. Studie, které se zabývají touto problematikou, se proto zaměřují zejména na pochopení role populace Treg a tolerogenní cytokinové prostředí v procesu těhotenských komplikací.

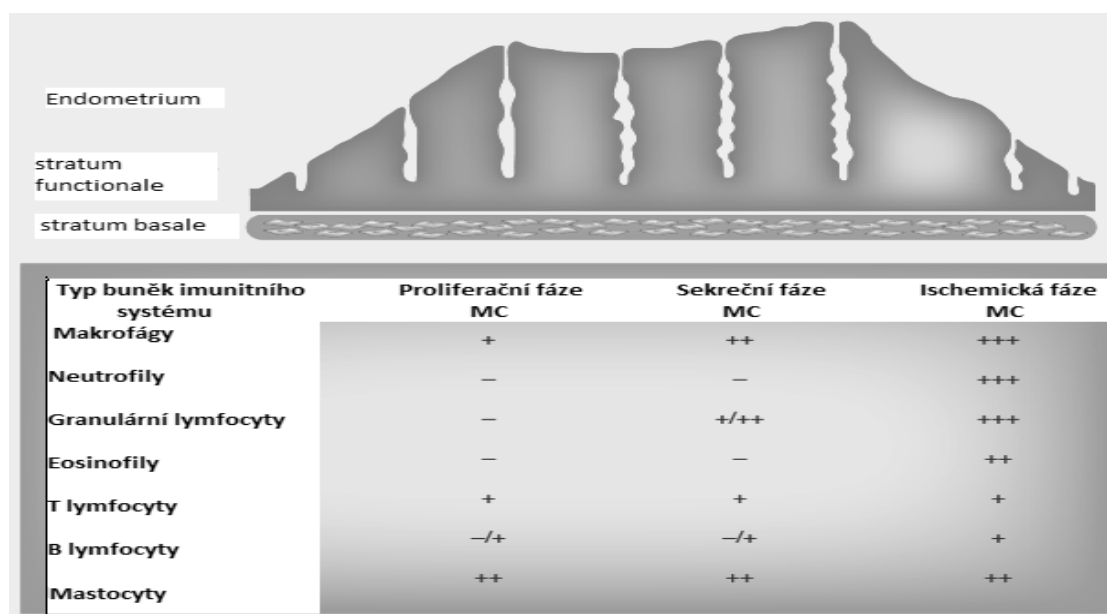
2 Těhotenství a imunita

Těhotenství je složitý, mnohostupňový děj, který je pro matčin imunitní systém výzvou. Plod a placenta představují chiméru složenou z mateřských deciduálních buněk a buněk fetálního trofoblastu. Placenta exprimuje paternální aloantigeny, které jsou pro matčin imunitní systém cizí. V průběhu těhotenství musí dojít ke komplexní změně chování imunitního systému, který navodí optimální podmínky pro správný růst a vývoj semialoantigeního plodu a navození jeho tolerance. Složky imunitního systému jsou důležitou součástí komunikační sítě mezi matkou a plodem a výrazným způsobem ovlivňují nejen celý proces gravidity od implantace embrya a angiogenezi spirálních tepen až po porod nového jedince. Patologické chování imunitního systému či nedostatečně navozená tolerance plodu mají negativní vliv na procesy spojené s lidskou reprodukcí a mohou být příčinou těhotenských komplikací.

Reprodukční cyklus člověka je souhrou mnoha dějů, z nichž např. menstruační cyklus, který je nedílnou součástí reprodukčního cyklu ženy, slizniční vnímavost, klíčová pro správnou implantaci embrya, nebo angiogeneze spirálních tepen jsou ovlivněny imunitním systémem.

2.1 Imunita a menstruační cyklus

Menstruace je fyziologický, vysoce regulovaný proces, který se vyskytuje u omezeného počtu živočišných druhů, jakými jsou lidé a lidoopi. Je zajišťována řadou přesně po sobě jdoucích dějů, ovlivněných působením endokrinního systému v kooperaci se systémem imunitním. Z pohledu imunitního systému se jedná o proces spojený s prozánětlivým prostředím. Na průběhu menstruačního cyklu se podílí celá škála imunokompetentních buněk imunitního systému, viz Obrázek 1.



Obrázek 1 Zastoupení jednotlivých populací imunokompetentních buněk v endometriu v jednotlivých fázích menstruačního cyklu.

Vysvětlivky: –: buňky nejsou přítomné, – / +: ojedinělá přítomnost, +: několik rozptýlených buněk, ++: střední počet rozptýlených buněk, některé ve shlucích, + / ++: střední počet rozptýlených buněk, +++: velké množství buněk, MC – menstruační cyklus. Převzato a upraveno (Berbic and Fraser 2013).

Během proliferační fáze převažuje působení subpopulace prozánětlivých Th1 lymfocytů (Th1-T helper cells 1). Pokud dojde na počátku sekreční fáze během ovulace k oplodnění oocyty,

je populace Th1 lymfocytů a cytokinové prostředí s ní spojené, klíčová pro implantaci embrya a angiogenezi spirálních tepen. Na konci sekreční fáze dochází k polarizaci pomocných lymfocytů k populaci Th2 (Th2-T helper cells 2). Cytokinové prostředí populace Th2 se podílí na ochraně semialogenního embrya před cytotoxickým působením imunitního systému (Lorenz, Heiman, and Demas 2015).

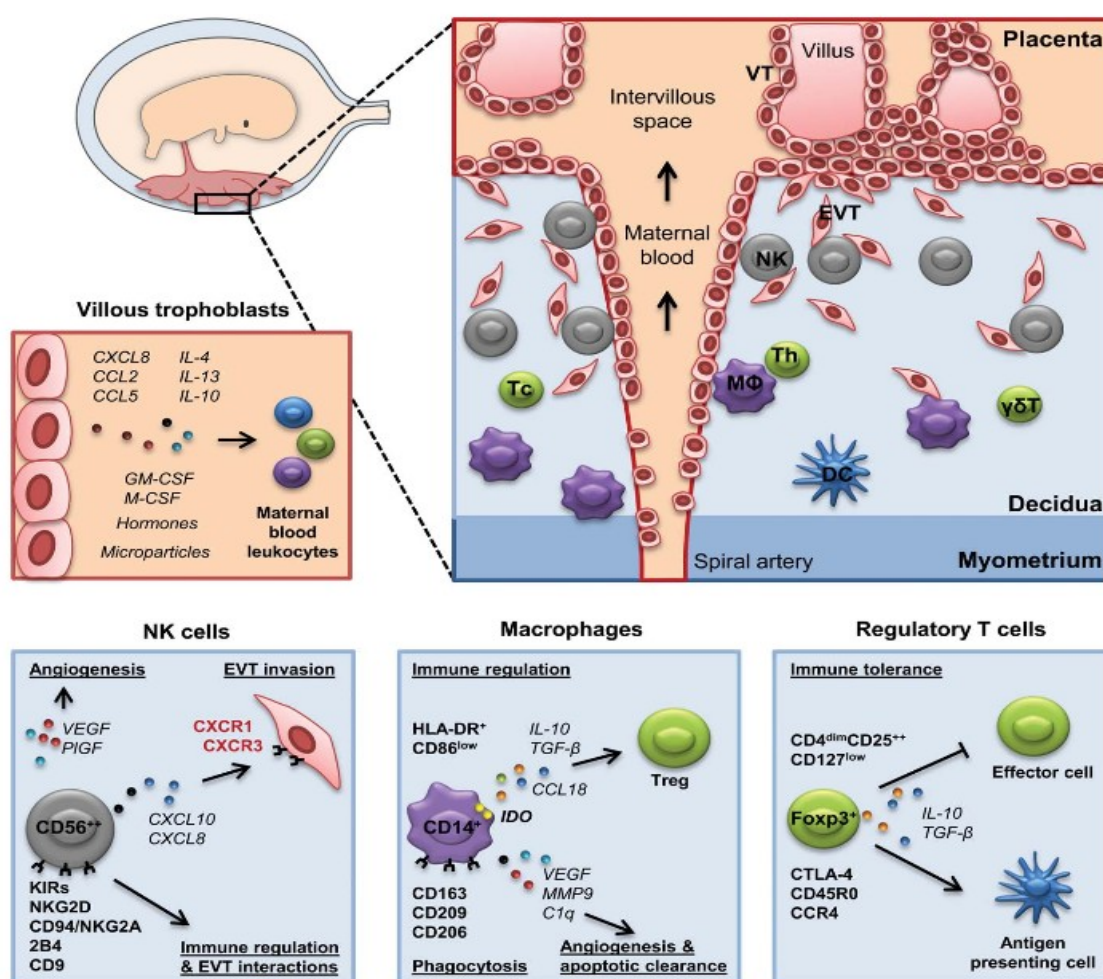
Klíčové je regulační působení populace Treg. Tato populace v období ovulace vlivem hormonů, řady chemokinů a jejich ligandů migruje z místních lymfatických uzlin do dělohy. V případě fertilizace a následné implantace embrya populace Treg suprimuje proliferaci cytotoxických buněk, které by mohly produkovanými cytokiny semialoantigenní zárodek poškodit. V případně neúspěšné fertilizace, migrují Treg zpět do místních lymfatických uzlin, kde jsou deponovány do počátku následujícího menstruačního cyklu (Saito et al. 2010).

2.2 Imunologie implantace

Implantace zárodku ve stádiu blastocytu je komplexní proces interakcí mezi endometriem, trofoblastem a embryoblastem, viz Obrázek 2. Velká část všech implantací končí neúspěšně. K selhání implantace přispívají genetické faktory, poruchy metabolismu zárodku, ale také nevhodná polarizace a regulace imunitního systému vedoucí ke snížené vnímavosti děložní sliznice a nedostatečně navozené toleranci. Vnímavost děložní sliznice je ovlivněna působením antimikrobních peptidů, specificky regulovaným prozánětlivým cytokinovým prostředím a přítomností deciduálních populací imunokompetentních buněk v místě implantace, které je klíčové jak pro samotný proces implantace, tak pro fyziologicky probíhající angiogenezi spirálních tepen (Dekel et al. 2014). Migrace Treg do místa implantace je částečně řízena chemotaktickým působením estrogenu, progesteronu a hCG (hCG - Human chorionic gonadotropin), které jsou produkovány tkání decidui.

Angiogeneze spirálních tepen je klíčový děj, nezbytný pro správný vývoj a růst plodu. Jejich nesprávná remodelace je spojena s mnoha těhotenskými komplikacemi - např. PE, růstovými retardacemi plodu, ztrátami plodu nebo předčasnými porody. Stěžejní roli hraje cytokinové prostředí tvořené zejména VEGF-A (VEGF-A - Vascular endothelial growth factor A), PlGF

(PIGF - Placental growth factor) a TGF- β (TGF- β - Transforming growth factor β) (Svensson-Arvelund et al. 2014). Tyto cytokiny jsou produkovány celou řadou deciduálních imunokompetentních i nehematopoetických typů buněk. Implantace je doprovázena zvýšeným zastoupením prozánětlivé populace Th1 lymfocytů a produkcí imunomodulačních cytokinů typu IL-6 (IL- Interleukin), IL-8, TNF- β (TNF- β -Tumor Necrosis Factor β), LIF (LIF- Leukemia inhibitory factor) a IFN- γ (IFN- γ - Interferon γ) v interakci s regulační populací Treg (Mor et al. 2011) .



Obrázek 2 Vliv imunitního systému při nastolení fetomaternálního rozhraní v místě implantace embrya a remodelace spirálních tepen.

Buňky plodu jsou v kontaktu s matčím imunitním systémem na dvou místech: (1) vilózní trofoblast (VT – villous trophoblasts) je obklopen imunitními buňkami matky v intervillózním prostoru a (2) v extravillózním prostoru dochází ke kontaktu extravillózního trofoblastu (EVT - extravillous trophoblasts) s matčím leukocyty. VT je schopen produkovat některé cytokiny a chemokiny a uvolňovat mikročástice schopné ovlivnit mateřské leukocyty. Hlavními populacemi deciduálních leukocytů jsou NK buňky (NK - Natural Killer), makrofágy (Mφ – makrofágy) a T lymfocyty cytotoxické

(Tc), pomocné (Th), γ/δ T-lymfocyty. Hlavní funkce NK buněk, makrofágů a Treg jsou shrnuty schématicky. NK buňky se podílejí tvorbou angiogenních a chemotaktických faktorů na remodelaci spirálních tepen a invazi EVT. Populace makrofágů má regulační vlastnosti a podílí se na udržení tkáňové hemostázy a odstranění apoptických mikročastic. Treg jsou populací, která hraje nepostradatelnou roli při nastolení fetomaternální tolerance a to zejména inhibicí aktivace T lymfocytů a interakcí s APC (APC - antigen presenting cells) a to zejména produkcí svých regulačních cytokinů IL-10 a TGF- β (TGF- β - Transforming growth factor β Převzato a upraveno (Svensson-Arvelund et al. 2014).

2.3 Navození fetomaternální tolerance

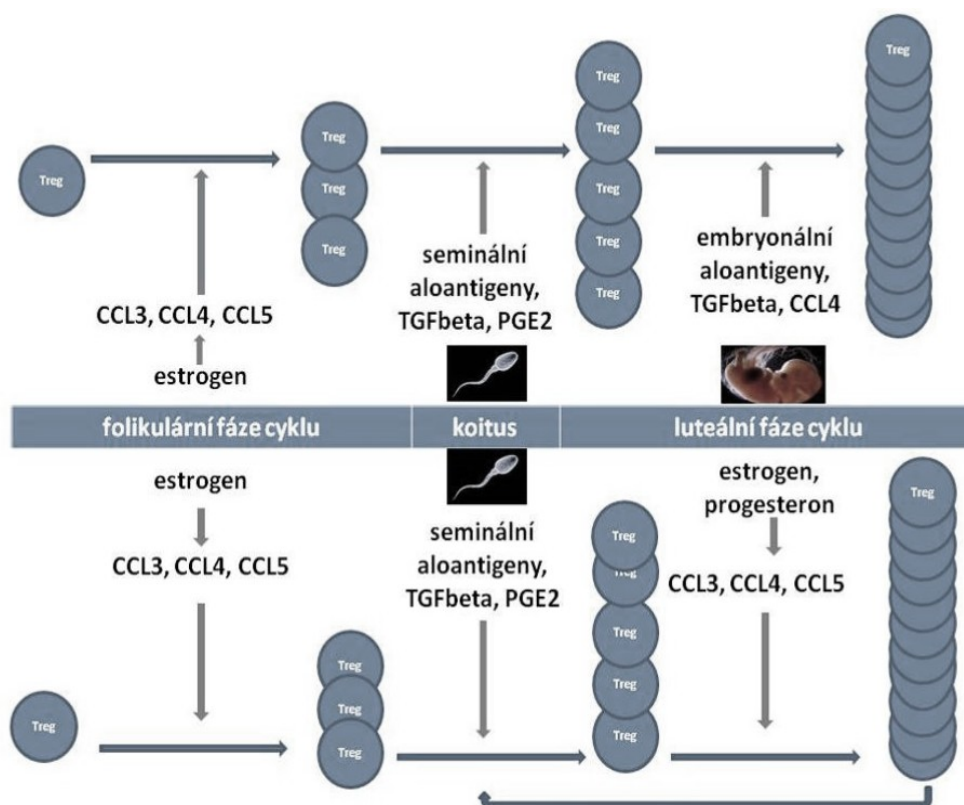
Plod a placenta vytvářejí chiméru, sestávající z mateřské deciduální buňky a buňky fetálního trofoblastu. Oběhové systémy matky a plodu nejsou zcela odděleny. Zejména mezi 8. až 12. týdnem těhotenství dochází ke kontaktu mezi mikročasticemi buněk plodu a imunitním systémem matky. V průběhu těhotenství dochází k procesu tzv. mikrochimérismu – přestupu omezeného množství buněk z krevního oběhu plodu do krevního oběhu matky a jejich kontaktu s matčíným imunitním systémem.

Tolerance imunitního systému je klasicky definována jako absence odmítnutí a úspěšná symbióza organismu s buňkami nebo tkáněmi organismu cizího. Klasický model imunitní tolerance se nemůže během těhotenství uplatnit. V případě, že by byla těhotná žena "imunologicky tolerantní", mohlo by dojít k poškození tkáně matky plodovými imunokompetentními T lymfocyty v místě styku placentárního trofoblastu s tkání jejího organismu. Naopak by mohlo dojít k napadení tkání embrya matčíným imunitním systémem. Proto je nutné nastavení specifického typu tolerance označované jako fetomaternální tolerance. Tento specifický typ, časově omezené, imunologické tolerance navozuje systémové změny v chování imunitního systému s cílem nastolení imunologické tolerance na straně matky i jejího semialogenního plodu. V navození fetomaternální tolerance hraje zásadní roli populace Treg, která reguluje diferenciaci ostatních populací CD4⁺ T lymfocytů a cytokinového prostředí. Cytokinové prostředí, ve kterém převládá působení TGF- β a IL-10, ovlivňuje diferenciaci imunokompetentní buňky v prostoru deciduy k jejich tolerogenním subtypům (Schumacher and Zenclussen 2014) .

K prvnímu kontaktu s aloantigeny otce a buňkami imunitního systému matky však dochází již při styku seminální plazmy s reprodukčním traktem ženy. Seminální plazma je produkována mužskými přídatnými pohlavními žlázami. Obecně je její funkce vnímána jako prostředek napomáhající transportu spermií v pohlavním ústrojí ženy. Slouží k výživě a integritě spermií. Seminální plazma obsahuje mimo jiné solubilní HLA antigeny otce, které po kontaktu s imunitním systémem ženy napomáhají navození tolerance budoucímu embryu.

Nebuněčná frakce seminální plazmy je koktejlem bioaktivních látek. Obsahuje cytokiny, prostaglandiny, hormony a jiné aktivní látky, které interagují s tkáněmi a s buňkami v pohlavním systému ženy a následně ovlivňují imunitní systém matky (Robertson 2005). Maternální dendritické buňky pohlcují solubilní HLA antigeny (HLA-Human leukocyte antigen) otce, obsažené v seminální plazmě, následně dochází k jejich aktivaci a migraci do lokálních lymfatických uzlin, kde se v procesu křížové prezentace diferencují a podílí se na indukci diferenciací populace antigen specifických Treg (Brown et al. 2013). V tomto procesu hraje zásadní roli i vysoká koncentrace cytokinu TGF- β (obsahuje izoformy TGF- β 1, TGF- β 2 a TGF- β 3) a PGE 2 (PGE2 – prostaglandin 2) (Robertson et al. 2013). Zatímco působení PGE2 vede kromě jiného k nespecifické indukci proliferace Treg, bez nutnosti ligace, působení TGF- β indukuje tvorbu zejména antigen specifických Treg. K cílené migraci populace dochází vlivem chemotaktického působení. Treg exprimují receptory pro steroidní hormony a hCG. Během ovulace dochází k jejich vysoké produkci, což ovlivňuje jejich cílenou migraci do dělohy (Robertson and Sharkey 2016).

Populace Treg disponuje také chemokinovými receptory typu CCL22, CX3CL3, CCL3, CC4, CCL5. Jejich ligandy se nacházejí na epitelu dělohy a na fetomaternálním rozhraní. (Robertson et al. 2013), viz Obrázek 3.



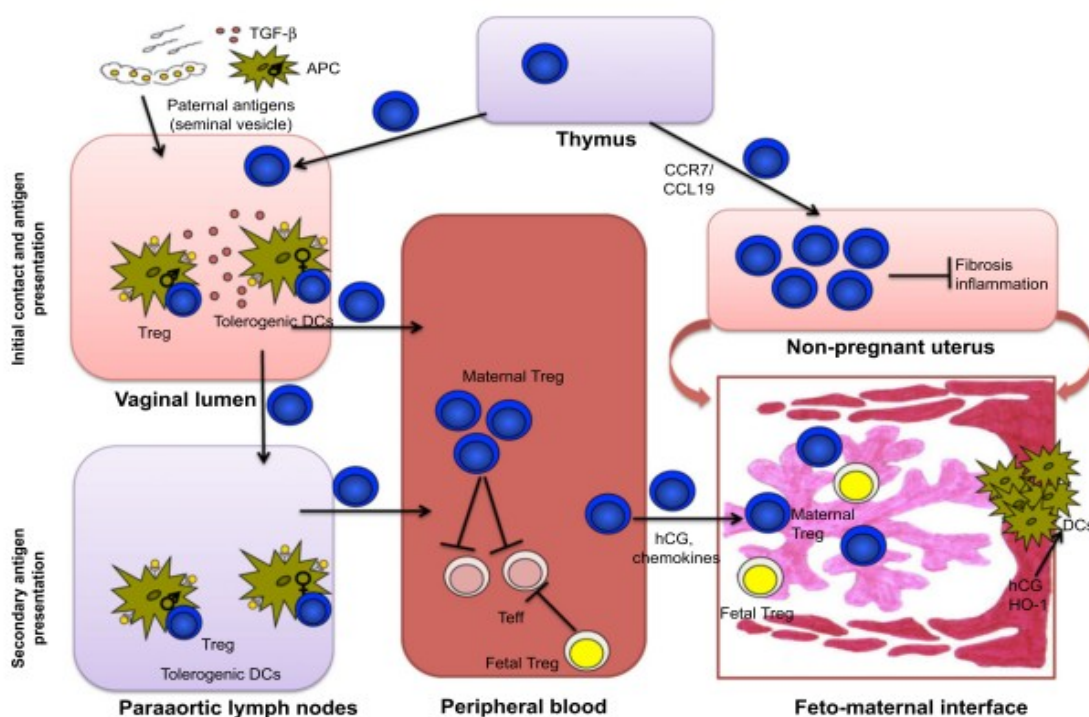
Obrázek 3 Schéma hormonálních vlivů a působení chemotaxe na migraci a diferenciaci populace T regulačních lymfocytů.

Již v průběhu folikulární fáze menstruačního cyklu dochází vlivem hormonů a působením chemokinů a jejich receptorů k cílené migraci Treg (Treg – Regulatory T cell) do dělohy. V období ovulace dochází po styku matčina imunitního systému se seminální plazmou, obsahující solubilní paternální aloantigeny, TGF- β (TGF- β - Transforming growth factor β) a PGE2 (PGE2 - Prostaglandin 2) k zvýšené diferenciaci Treg. Pokud k oplodnění vajíčka dojde, Treg napomáhají k navození tolerance plodu. V případě, že k oplodnění nedošlo, migrují Treg do nejbližších lymfatických uzlin, kde jsou deponovány do doby příští ovulace převzato MUDr. Karin Malíčková.

TGF- β je obsažen v seminální plazmě v latentní - neaktivní formě. V této formě je v oblasti pochvy naabsorbován na hlavičky spermií a spolu s nimi migruje do vyšších oblastí pohlavního traktu ženy. Vlivem kyselého pH v ženském pohlavním traktu dochází k jeho transformaci na aktivní dimerní formu TGF- β (Robertson and Sharkey 2016).

V případě úspěšné fertilizace následuje proces implantace embrya do děložní stěny. Při tomto procesu dochází ke kontaktu matčina imunitního systému se semialoantigenním

embryem. Prvním místem kontaktu jsou klky trofoblastu, které jsou obklopeny buňkami matčina imunitního systému v intravilózním prostoru. Druhým místem je prostor extravilózního trofoblastu (EVT), který je v kontaktu s populací deciduálních leukocytů (Svensson-Arvelund et al. 2014). Tyto oblasti jsou stěžejními pro navození fetomaternální tolerance a je zde nutné nastolit správný poměr mezi rychle se měnícími vlastnostmi, počty a funkcí populací imunokompetentních buněk a cytokinovým prostředím a klíčovou regulační funkcí zde má populace Treg, viz Obrázek 4.



Obrázek 4 Předpokládaný vzorec navození fetomaternální tolerance zprostředkované populací T regulačních lymfocytů.

Thymus je centrálním místem produkce T lymfocytů, včetně Treg (Treg - Regulatory T cell). Ty migrují do dělohy ještě před samotným oplodněním oocyty, aby navodili tolerogenní prostředí pro případnou implantaci embrya. Solubilní otcovské antigeny se nacházející v seminální plazmě a jsou prezentovány mateřskému imunitnímu systému v prostoru vaginálního lumen. Seminální plazma obsahuje také tolerogenní populaci DC (DC - Dendritic cells), která podporuje diferenciaci Treg v lymfatických uzlinách. V periferní krvi se Treg zapojují do potlačení mateřských efektorových T lymfocytů. Ne zcela objasněnou roli mají v nastolení tolerance i fetální Treg. hCG - Human chorionic gonadotropin, převzato (Schumacher et al. 2014).

3 Těhotenství a imunitní systém

V průběhu fyziologického těhotenství je decidua bohatě infiltrována nejen populací Treg, ale také jinými imunologicky aktivními buňkami přirozené i adaptivní imunity. Ty mají převážně specifický tolerogenní fenotyp. Mezi populaci přirozené imunity, které zásadně ovlivňují průběh těhotenství, patří dNK buňky (dNK - Decidua Natural Killer), dMac (dMac – decidual macrophages) a dDC (dDC – Decidual Dendritic cells). Klíčové je i působení adaptivních složek imunity, zastoupené zejména populacemi T lymfocytů - Treg, γ/δ T-lymfocyty a vhodnou polarizací zejména populace Th1 a Th2 v různých stádiích gravidity. Decidua je jen minimálně infiltrována B lymfocyty. (Szekeres-Bartho, Markert, and Varla-Leftherioti 2015).

3.1 Deciduální makrofágy

Fenotyp dMac je definován jako $CD14^+HLA^+DR^+CD206^+CD209^+$ s nízkou expresí kostimulačních molekul CD80/CD86. Jedná se o dominantní populaci APC (APC- Antigen presenting cells) v decidue. dMac jsou speciální subpopulací, která se vymezuje z paradigmatu fungování a diferenciaci M1 a M2 makrofágů. Svým funkčním charakterem fungování se více podobá alternativně aktivovaným makrofágům M2. K diferenciaci dMac dochází pod vlivem M-CSF (M-CSF - Macrophage colony-stimulating factor), regulačního cytokinového prostředí a hormonů jakými je např. relaxin. Diferenciace populace M1 makrofágů je v prostředí decidui potlačena vlivem vysoké koncentrace progesteronu, který inhibuje tvorbu TGF- α , NO a IL-12 (Houser 2012).

dMac napomáhají implantaci embrya - ovlivňují produkci fukosyltransferázy – FUT 1 (FUT 1 – Fucosyltransferase 1) a FUT 2 (FUT 2- Fucosyltransferase 2) - enzymů, které se podílejí na syntéze fukosylovaných ligandů, potřebných k upevnění vazby mezi zárodkem a buňkami endometria. dMac mají zvýšenou fagocytární aktivitu a spolu s C1q složkou komplementu napomáhají udržení homeostázy tkáně odstraněním apoptických mikročástic uvolňovaných ze zárodku. Zvýšené množství mikroapoptických částic by mohlo vést k indukci těžkých zánětlivých procesů v oblasti decidui spojených s těhotenskými komplikacemi (Gustafsson et al. 2008).

Populace dMac produkuje VEGF, který zásadně ovlivňuje nastolení angiogenezi spirálních tepen. Podílí se na tvorbě IDO (IDO – Indolamin-2,3-dioxygenasa) a TGF- β , pod jehož vlivem dochází k diferenciaci regulační populace Treg (Ning, Liu, and Lash 2016).

3.2 Deciduální dendritické buňky

Populace dDC (dDC- decidual dendritic cells) je členem heterogenní rodiny DC (DC - dendritic cells). dDC jsou diferencovány pod vlivem estrogenu a progesteronu a cytokinového prostředí tvořeného IL-10 a TGF- β . dDC jsou považovány za tolerogenní populaci, pro kterou je charakteristická snížená exprese kostimulačních molekul CD80 a CD86, čímž ovlivňuje aktivaci efektorových T lymfocytů (Eriksson et al. 2006). Podílí se na tvorbě tolerogenního cytokinového prostředí, které zajišťuje příznivý poměr Th1 a Th2 populace během těhotenství, polarizovaný spíše k populaci Th2 (Mun et al. 2014).

3.3 Neutrofilní granulocyty

Neutrofilní granulocyty jsou distribuovány po celém reprodukčním traktu. Napomáhají k odstranění sliznice během menstruace a poškozených spermií z reprodukčního traktu ženy. Produkují antimikrobní peptidy, které jsou nezbytné pro zvýšenou děložní vnímavost a implantaci embrya. (Starkey, Clover, and Rees 1991).

3.4 Deciduální NK buňky

Deciduální NK buňky jsou unikátní populací CD3⁻CD56⁺⁺CD16⁻ NK buněk s inhibičním fenotypem. Exprimují znak CD9, který není na NK buňkách periferní krve exprimován (Gibson et al. 2015). Diferenciace dNK probíhá pod vlivem IL-15 produkovaných zejména DC. Jejich cytotoxické působení je značně omezeno, jsou však primárním zdrojem cytokinů zapojených do trofoblastické invaze a angiogeneze (Lash, Robson, and Bulmer 2010).

Funkční inhibice populace NK s cytotoxickým charakterem spočívá ve vazbě na HLA exprimovaných trofoblastem na jejich inhibiční receptory. Trofoblast neexprimuje klasické molekuly MHC I (MHC I - Major histocompatibility complex I.) ani MHC II (MHCII - Major histocompatibility complex II). Exprimuje zejména neklasické MHC I b typu HLA-G (King et al. 2000). Ty jsou rozpoznávány inhibičními receptory KIR (KIR-Killer immunoglobulin-like receptor) exprimovanými NK buňkami (Ferreira et al. 2017), což vede k potlačení cytotoxické funkce NK buněk.

Procesy kooperace jednotlivých buněčných populací a jejich funkcí jsou velmi provázané a přísně koordinované s cílem navodit optimální prostředí pro vývoj jedince.

3.5 Ostatní složky imunity a těhotenství

Reprodukční cyklus člověka a těhotenství jako takové je ovlivněno také přirozenou částí imunitního systému. Důležitými faktory, které se podílejí na zdárném vzniku a průběhu těhotenství, jsou antimikrobní peptidy. Endometriální vnímavost, nutná pro implantaci embrya je zvyšována např. SLPI (SLPI - Secretory leukocyte protease inhibitor) a to již během menstruačního cyklu (Wira et al. 2010). Nezastupitelnou roli v procesu reprodukce hraje i komplementový systém. Ten se podílí na udržení homeostázy a to zejména odstraňováním apoptických mikročástic uvolňovaných ze zárodku. Poruchy jeho funkce jsou spojovány s těžkými záněty choriových klků a předčasnými porody (Girardi et al. 2006).

3.6 Buněčné složky adaptivní imunitní imunity a těhotenství









Fertilizace, implantace, angiogeneze spirálních tepen a navození fetomaternální tolerance jsou děje spjaté zejména s fungováním buněčné složky imunitní odpovědi, a to zejména složkou pomocných T lymfocytů. Zásadní je nastolení tolerogenního cytokinového prostředí a potlačení cytotoxického působení T lymfocytů. Klíčovou roli hraje regulace prozánětlivého prostředí nutného pro implantaci s následnou polarizací k populaci Th2, jejichž cytokiny nemají embryotoxický efekt. K této regulaci výrazně přispívá populace Treg a produkce jejich

cytokinů TGF- β a IL-10, které indukují proliferaci tolerogenních populací deciduálních buněk imunitního systému. Předpoklad o kooperaci fungování pomocných T lymfocytů během těhotenství byl shrnut jako Th1/Th2/Th17/Treg paradigma (Saito et al. 2010).

3.6.1 Th1/Th2/Th17/Treg paradigma v těhotenství

Zásadní vliv na průběhu fyziologického těhotenství hraje fungování a kooperace populací CD4⁺ pomocných T lymfocytů, zejména populací Th1, Th2, Th17 a Treg. Tato kooperace byla popsána prof. Saitem jako Th1/Th2/Th17/Treg koncept fungování pomocných T lymfocytů v těhotenství (Saito et al. 2010), viz Tabulka 1. Jeho teorie vychází z poznatků Thomase Wegmana, který v roce 1993 popsal vliv Th1/Th2 na navození fetomaternální tolerance (Wegmann et al. 1993) jako klíčový pro průběh fyziologického těhotenství.

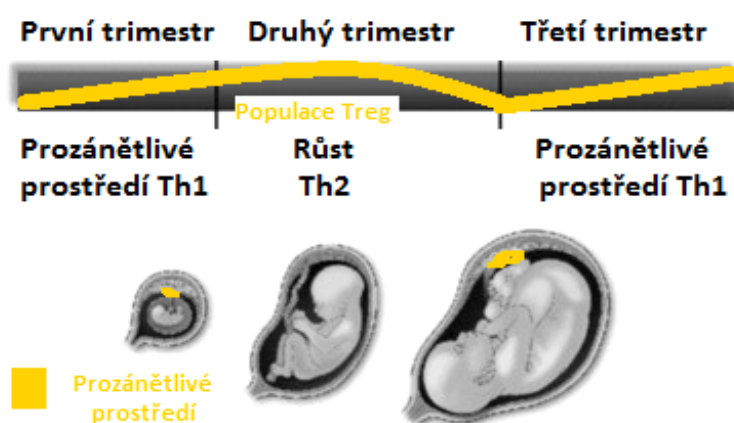
Tabulka 1 Populace Th1/Th2/Th17 a Treg ve fyziologickém a patologickém těhotenství v periferní krvi a děloze.

	Th1	Th2	Th17	Treg
periferní krev				
děloha				

Treg - Regulatory T cell, Th1 - T helper cells 1, Th2 - T helper cells 2, Th17 - T helper cells 17. Převzato a upraveno (Saito et al. 2010).

Pomocné lymfocyty a produkce jejich cytokinů hrají ústřední úlohu v modulaci imunitní odpovědi v průběhu těhotenství. Ve fyziologicky fungujícím imunitním systému by mělo být zastoupení jednotlivých populací pomocných T lymfocytů v rovnováze. Během těhotenství je tato rovnováha porušena. V několika studiích byla potvrzena hypotéza o predominanci populace Th2 a potlačení populace Th1 jako nezbytného posunu v rovnováze pomocných lymfocytů pro zdárný průběh těhotenství (Saito et al. 2011). Tento stav neplatí pro celé období těhotenství. V časných fázích těhotenství je pro samotnou implantaci a angiogenezi

spirálních tepen nutná produkce prozánětlivých cytokinů IFN- γ a TNF- α produkovaných Th1 populací. Tyto cytokiny mají však silný embryotoxický efekt a jejich zvýšené hladiny jsou spojeny také s těhotenskými ztrátami. Je tedy nutná specifická regulace imunitního systému, která by po implantaci embrya a angiogenezi spirálních tepen polarizovala populaci pomocných T lymfocytů směrem k populaci Th2 a produkci cytokinu typu IL-2, napomáhající navození tolerance. Obdobně je tomu na konci III. trimestru, kdy dochází ke zvýšené produkci IFN- γ a indukci prozánětlivého prostředí jako příprava organismu na fyziologický porod (Chaouat et al. 2003), viz Obrázek 5



Obrázek 5 Fáze těhotenství a polarizace populací pomocných lymfocytů.

Rané fáze těhotenství je spojeno s prozánětlivým prostředím a populací Th1. V druhé fázi těhotenství dominuje protizánětlivé a populace Th2. Konec těhotenství, zejména období před porodem, je spojeno s prozánětlivým prostředím populace Th1. Celé těhotenství je pod vlivem regulačních vlastností Treg. Treg - Regulatory T cell, Th1 - T helper cells 1, Th2 - T helper cells 2. Převzato a upraveno (Mor et al. 2011)

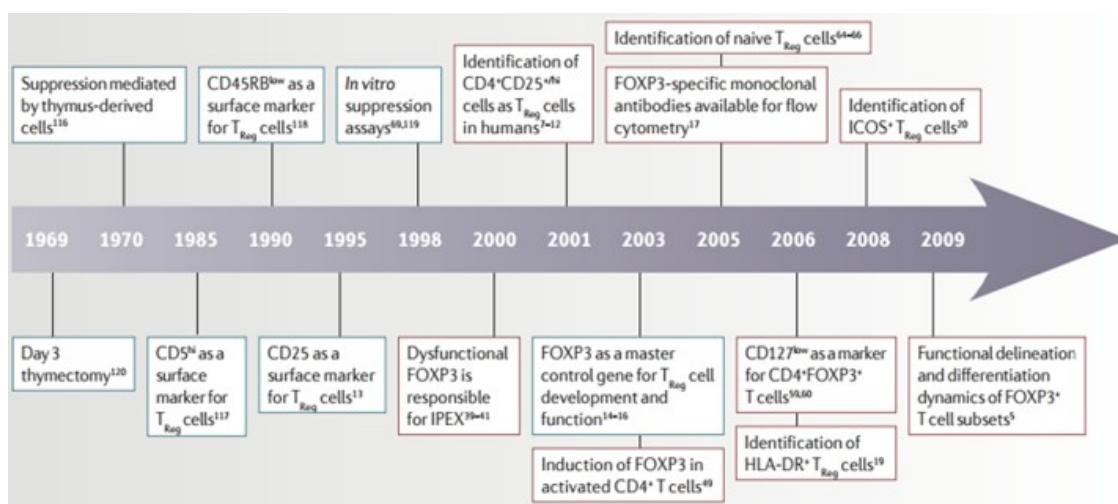
Populace Th17 zastoupena v periferní krvi u zdravé populace je velmi málo početná. Stejně tak tomu je i v I. a II. trimestru těhotenství. K signifikantnímu poklesu v periferní krvi dochází ve III. trimestru (Santner-Nanan et al. 2009). Opačná situace nastává v decidue, kde dochází ke zvýšenému zastoupení populace Th17, která v oblasti nesterilní dělohy zajišťuje ochranu před patogenními mikroorganismy (Saito et al. 2011).

4 T regulační lymfocyty

Populace Treg se zdá být klíčová zejména v navození tolerogenního prostředí, nutného pro správný vývoj plodu. Regulační vlastnosti Treg vycházejí z mechanismu jejich působení na efektorové T lymfocyty, maturaci DC, supresi cytotoxických složek imunity a produkci cytokinů nutných k diferenciaci tolerogenních populací deciduálních buněk. Studie sledující vliv Treg na těhotenství naznačují snížené zastoupení této populace u řady těhotenských komplikací, např. PE (PE-Pre-eclampsia) (Toldi et al. 2015), opakovanými ztrátami plodu nebo předčasnými porody před 35. týdnem těhotenství (Saito et al. 2010). Tyto komplikace s sebou nesou rizika spojená se zvýšenou mortalitou i morbiditou plodu a jsou přisuzovány špatnému nastavení fetomaternální tolerance, neúspěšné implantaci nebo angiogenezi spirálních tepen již v raných fázích těhotenství.

4.1 Obecná charakteristika populace T regulačních lymfocytů

Populace $CD4^+$ Treg patří spolu s minoritní populací $CD8^+$ Treg, regulačními makrofágy a regulačními B lymfocyty do rodiny buněk s regulačními a reparačními vlastnostmi. Procentuální zastoupení mezi $CD4^+$ lymfocyty činí u člověka 5 až 10% (Sakaguchi et al. 2008). Treg jsou funkčně i diferenciačně kontrolovány transkripčním faktorem Foxp3 (Foxp3 - Forkhead box P3), jehož gen se nachází na X chromozomu, patří do Forhed/winged-helix rodiny (Shohei et al. 2002). Jedná se o velmi heterogenní populaci buněk, popsanou v nedávné minulosti. Časová osa popisující objev fenotypových znaků u lidí a myší je popsána na Obrázku 6.



Obrázek 6 Časová osa popisující objev regulačních T lymfocytů a jejich fenotypu u lidí a myší.

Modrý rámeček obsahuje fenotyp Treg (Treg - Regulatory T cell) u myší, červený rámeček fenotyp Treg u lidí. Foxp3 - Forkhead box P3, ICOS - Inducible T cell co-stimulator, IPEX - immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome, převzato (Sakaguchi et al. 2010).

Základní funkcí Treg je regulace imunitních reakcí. Potlačují aktivaci, proliferaci a efektorovou funkci většiny imunitních buněk, inhibují produkci cytokinů pomocných i cytotoxických typů lymfocytů. Koordinují produkci protilátek a jejich izotopový přesmyk. Inhibují cytotoxické vlastnosti NK buněk, maturaci a diferenciaci makrofágů a dendritických buněk s cílem zamezit poškození organismu imunitní reakcí (Sakaguchi et al. 2010).

Treg hrají důležitou roli v prevenci vzniku autoimunitních chorob, imunopatologických reakcí, napomáhají toleranci allotransplantátu, podílí se na udržení orální tolerance, mají zásadní vliv na udržení fetomaternální tolerance (Sakaguchi et al. 2008).

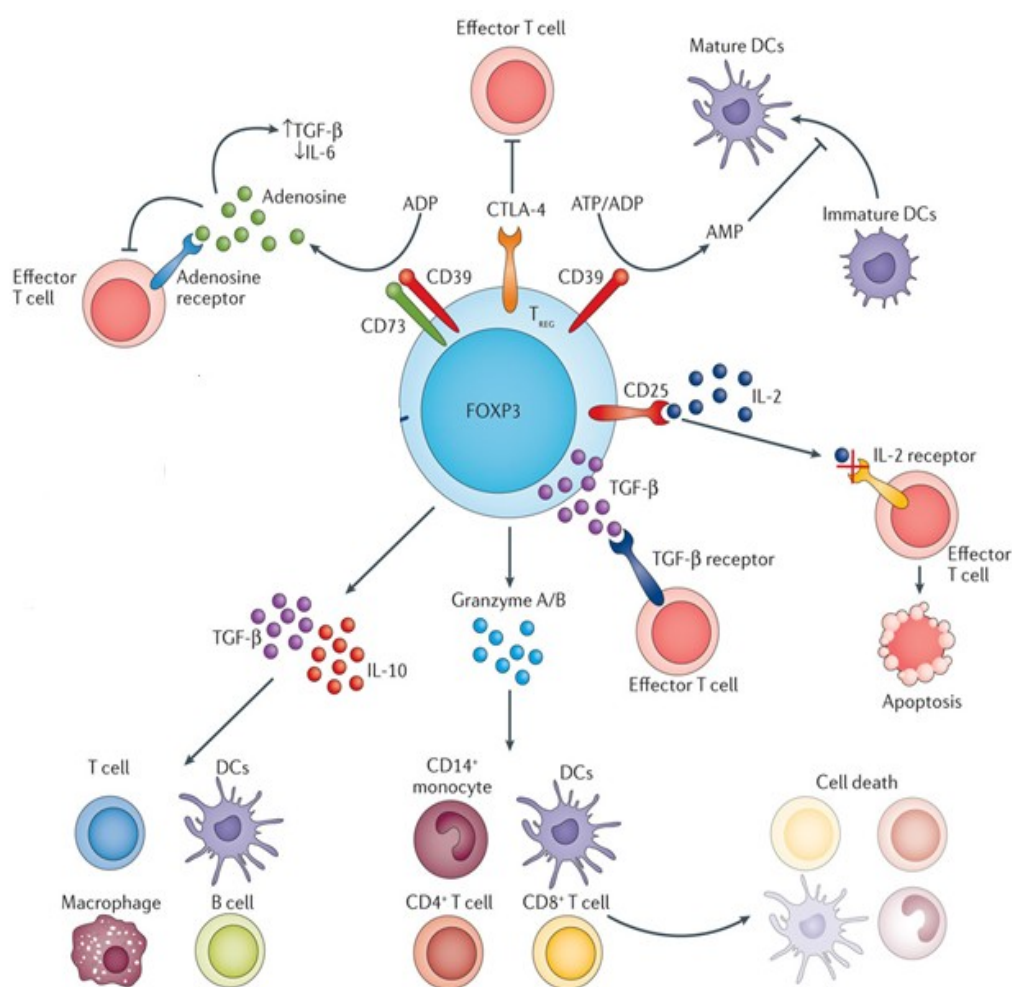
Populaci Treg je možné rozdělit do dvou základních subpopulací. První subpopulací jsou Treg vzniklé v procesu pozitivní selekce v thymu. Tato subpopulace byla pojmenována jako přirozené Treg – nTreg (nTreg - „natural“ regulatory T cells). Druhou subpopulací jsou tzv. indukované Treg – iTreg (iTreg – „induced“ regulatory T cells). Tato frakce se diferencovala z naivních $CD4^+$ T lymfocytů vlivem cytokinového prostředí, zejména TGF- β a IL-2, po antigenní stimulaci TCR v periferních částech těla (Sakaguchi et al. 2010).

Důležitou roli v diferenciaci nTreg v thymu, hraje avidita TCR k autoantigenům prezentovaných buňkami thymického epitelu. V případě nTreg se jedná o střední sílu avidity tj. pod prahem nezbytným pro delecii. Roli hraje i síla vazby kostimulačních signálů poskytovaných APC a složením cytokinového prostředí. nTreg migrujících z thymu do periferních oblastí těla, zejména do sekundárních lymfatických orgánů (Miyara et al. 2007). Nepřítomnost nTreg vede k vzniku autoimunitních onemocnění. Novorozenecká thymektomie brání diferenciaci nTreg a vede k autoimunitním zánětům ovarií u žen a varlat u mužů (Clark 2016).

Populace Treg tzv. „indukované“ Treg – iTreg vznikají v periférii, zejména na sliznicích, z konvenčních naivních $CD4^+$ T lymfocytů. K jejich diferenciaci dochází vlivem antigenní stimulace TCR receptoru za přítomnosti kyseliny retinové v cytokinovém prostředí tvořeném zejména IL-2 a TGF- β . Následně Treg migrují do lokálních lymfatických uzlin, kde dochází k jejich další specifické diferenciaci (Haribhai et al. 2011).

4.2 Mechanismus regulace zprostředkované T regulačními lymfocyty

Mechanismy regulace imunitního systému zprostředkované působení Treg lze rozdělit do třech základních typů, viz Obrázek 7. První mechanismus regulace imunitního systému populací Treg je zprostředkován tvorbou cytokinů. Druhý mechanismus regulace je založen na přímém kontaktu Treg s cílovou buňkou, která vyústí cytolýzou cílové buňky. Třetí mechanismus regulace zahrnuje modulaci funkce a maturace DC.



Obrázek 7 Schéma mechanismu regulace zprostředkované T regulačními lymfocyty.

Regulační funkce Treg (Treg - Regulatory T cell) spočívá v produkci cytokinů, zejména IL-10 (IL – Interleukin) a TGF-β (TGF-β - Transforming growth factor β), působení granzymu A a B, vyčerpání IL-2 z prostředí, na vazbě CTLA-4 (CTLA-4 - Cytotoxic T lymphocyte antigen 4) na kostimulační molekulu CD80/CD86 na efektorových T lymfocytech, která vede k jejich inhibici nebo ovlivnění funkce a maturace DC (DC - Dendritic cells). ATP – Adenosine triphosphate, ADP - Adenosine diphosphate, Foxp3 - Forkhead box P3. Převzato a upraveno (Meng et al. 2015).

4.3 Regulace zprostředkovaná cytokinovým prostředím

Populace Treg je producentem regulačních cytokinů TGF- β , IL-10 a IL-35. Jedná se o cytokiny navozující tolerogenní cytokinové prostředí spojenou se supresí efektorových funkcí imunitní odpovědi.

TGF- β je významný pleiotropní cytokin ovlivňující diferenciaci buněk, morfogenezi a remodelaci tkání, účastní se regulace zánětlivých procesů, apoptózy a regulaci imunitních reakcí. Bylo popsáno pět izoform tohoto cytokinu. TGF- β je syntetizován v podobě homodimeru pro-TGF- β prekurzor. Následně je proteolyticky štěpen furinem za vzniku latentního TGF- β a proteinu LAP (LAP-mLatency associated peptide). LAP se nekovalentně váže na „maturovaný“ TGF- β za vzniku komplexu SLC (SCL- Small Latent Complex). V této podobě je následně exprimován. TGF- β se může vázat také na LTBP (LTBP latent-TGF- β -binding protein) za vzniku LLC (LLC- Large Latent Complex). Tento komplex je uchováván ve formě depositu cytokinu v extracelulární matrix. TGF- β se může na Treg nacházet na membráně také ve formě transmembránového proteinu, čímž Treg propůjčuje schopnost regulace zprostředkované přímým kontaktem (Probst-Kepper et al. 2009).

IL-10 patří do rodiny protizánětlivých cytokinů, jehož zásadní funkcí je inhibice prezentace antigenu. Inhibuje expresi MHC II a kostimulačních molekul CD80 a CD86. IL-10 inhibuje diferenciaci a zrání DC (Akdis and Blaser 2001). Dále se podílí na proliferaci B lymfocytů a produkci protilátek. Reguluje signální dráhu transkripčního faktoru NF- κ B (NF- κ B - Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells). Zdrojem IL-10 jsou také monocyty, makrofágy, Th2 a B lymfocyty. V počátečních stádiích zánětu je IL-10 produkován Treg jen v nízkých koncentracích. V pozdějších fázích zánětu přebírají Treg primární roli v tvorbě IL-10 (Gaur et al. 2014).

IL-35 je posledním objeveným cytokinem produkovaným populací Treg. IL-35 patří do rodiny cytokinů IL-12. Je produktem dvou genů (Ebi3 a Il12a), z nichž přinejmenším jeden (Ebi3) je pod kontrolou Foxp3. IL-35 je důležitou součástí repertoáru Treg - jeho nepřítomnost negativně ovlivňuje jejich regulační schopnosti a Treg jsou zároveň hlavním producentem tohoto cytokinu. Přesný mechanismus fungování IL-35 není prozatím znám (Li et al. 2012).

4.4 Suprese cytolyzou

Populace Treg je schopna navodit apoptózu cílové buňky. Jeden z mechanismů navození apoptózy je založený na působení cytotoxických granul. Tento mechanismus byl dlouhá léta přisuzován pouze NK buňkám a CD8⁺ T lymfocytům, ovšem cytotoxická granula s obsahem granzymu A a B jsou také součástí vybavení populace Treg. Apoptózu cílové buňky je schopná populace Treg navodit také vazbou CD95 na CD95L (Meng et al. 2015). Populace Treg exprimuje vysokoafinitní receptor pro IL-2, který je schopen vazby IL-2 v okolí s vyšší afinitou než ostatní subpopulace T lymfocytů. Vyčerpání IL-2 z prostředí vede k apoptóze efektorových T lymfocytů. Treg samotné IL-2 neprodukuje, ale jsou esenciální pro jejich diferenciaci.

Další možný mechanismus regulace imunitních reakcí populací Treg je zprostředkován adenosinem. Klíčovou roli hraje vazba molekul CD39 a CD73, která vede k hydrolýze extracelulární ATP (ATP- Adenosine triphosphate) na adenosin. Adenosin je schopen se navázat na adenosinový receptor na efektorových T lymfocytech vedoucí k inhibici exprese IL-6 a k podpoře exprese TGF- β , což inicializuje diferenciaci Treg a potlačení efektorových T lymfocytů (Miyara and Sakaguchi 2007). V neposlední řadě je populace Treg schopna inhibice přenosem cAMP (cAMP- Cyclic adenosine monophosphate) do cílové buňky. Treg dokáže cAMP shromažďovat ve svém intracelulárním prostoru. Po přímém kontaktu Treg s cílovou buňkou dochází k přenosu cAMP prostřednictvím gap junction, což vyvolá inhibici proliferace a produkce IL-2 v efektorových T lymfocytech a k jejich cytolyze. Tento mechanismus je používán zejména nTreg (Bopp et al. 2007).

4.5 Suprese zprostředkovaná modulací zrání a funkce dendritických buněk

Modulace zrání a funkce DC populací Treg je založena na vazbě inhibičních molekul exprimovaných populací Treg na kostimulační molekuly CD80/CD86 na DC. Těmito inhibičními molekulami jsou CTLA-4 (CTLA-4 - Cytotoxic T lymphocyte antigen 4) a PD-1 (PD-1 - Programmed cell death protein 1).

Molekula CTLA-4 je známá také jako CD152. Je členem imunologické rodiny adhezních molekul, který je považován za jeden z imunologických kontrolních inhibičních bodů potlačujících imunitní reakci. Je homologem molekuly CD28 exprimované na T lymfocytech. Váže se na kostimulační molekuly CD80 a CD86 na DC s mnohem větší afinitou i aviditou, než tomu je u vazby molekuly CD28 na efektorových T lymfocytech. V Treg se nachází ve formě intracelulárního proteinu, po aktivaci Treg dochází k jeho expresi na povrchu (Mattci, Golstein, and Lefranc 1988). Po vazbě CD80/CD86 na CTLA-4 dochází ke zvýšené expresi IDO, která vede k potlačení diferenciaci efektorových T lymfocytů způsobené vyčerpáním Tryptofanu (Sojka, Hughson, and Fowell 2009).

Molekula PD-1, známá také jako CD271, slouží stejně jako CTLA-4 jako kontrolní inhibiční bod imunitních reakcí. Řadí se do rodiny imunoglobulinových receptorů. Je exprimována na pro-B lymfocytech a aktivovaných T lymfocytech, DC, makrofázích. Ligandem pro vazbu PD-1 je PD-1L (PD-1L - Programmed death-ligand 1) a PD-2L (PD-2L- Programmed death-ligand 2), který je exprimován na řadě buněk imunitního systému a na některých nehematopoetických typech buněk, např. buňkách fetálního trofoblastu. Po vazbě PD-1 na PD-1L dochází k inhibici TCR zprostředkované tvorby IL-2 a tím k útlumu efektorových funkcí DC (Sheppard et al. 2004).

4.6 Diferenciační znaky T regulačních lymfocytů

Populace Treg exprimuje řadu znaků, různého stupně maturace nebo funkce, viz Tabulka 2. Jako základní diferenciační znak populace Treg byl ustanoven transkripční faktor Foxp3. Patří do rodiny Foxhead box – transkripčních faktorů, které hrají důležitou roli v regulaci exprese genů zapojených do buněčného růstu, proliferace a diferenciaci (Saito et al. 2013a).

Tabulka 2 Fenotypové markery T regulačních lymfocytů

Transkripční faktor	Aktivační a paměťový fenotyp	Homing	Supresorová a efektorová funkce	Apoptóza, přežití, ostatní
Foxp3	CD45RA	CD62L	CTLA-4	CD25
	CD45RO	CCR4	ICOS	PD1
	CD25	CCR6	LAP	GARP

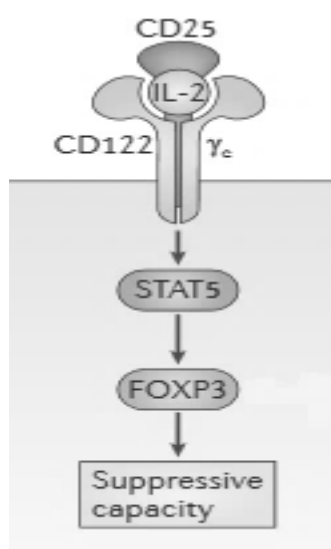
Vysvětlivky: *Foxp3* - Forkhead box P3, *CCR* - chemokin receptor, *CTLA-4* - cytotoxic T lymphocyte antigen 4, *ICOS* - Inducible T cell co-stimulator, *LAP* - latency-associated peptide, *PD1* - programmed cell death 1, *GARP* - glycoprotein A repetitions predominant. Převzato a upraveno (Sakaguchi et al. 2010).

Jeho intracelulární exprese koreluje s regulační aktivitou Treg. Foxp3 interferuje s AP-1 (AP-1 - Activator protein 1) o vazbu na NFAT (NFAT - Nuclear factor of activated T-cells) v oblasti IL-2 promotoru a brání tak transkripci genu pro IL-2. Zároveň se podílí na snížení genové exprese genu pro IL-4 a IFN- γ , která vede ke snížené proliferaci T lymfocytů. Naopak funguje jako transkripční aktivátor pro řadu genů nezbytných pro správnou funkci Treg, jakými jsou např. CTLA-4 a GITR (GITR - glucocorticoid-induced tumor necrosis factor recept (Bao et al. 2016)).

Mutace genu Foxp3 vede ke vzniku fatálního imunitního onemocnění – IPEX (IPEX - Immunodysregulation, polyendocrinopathy and enteropathy, X-linked syndrome). IPEX je soubor mnohočetných autoimunitních endokrinopatií, ke kterým se přidružují i autoimunitní onemocnění neendokrinního původu. Tento vzácný syndrom patří do skupiny primárních imunodeficitů spojených s mutací transkripčního faktoru Foxp3, jehož následkem je snížená absence supresivních vlastností Treg a polarizaci T lymfocytů k prozánětlivé populaci Th17, což přispívá k progresi onemocnění (Gambineri et al. 2008).

Molekula CD25 je α podjednotkou receptoru pro IL-2 a spolu s podjednotkou IL-2R β (CD122) a IL-2R γ (CD132) tvoří vysokoafinitní receptor cytokinu IL-2. Jedná se o receptor I. typu, patřící do skupiny receptorů se společným γ řetězcem, viz Obrázek 8. Populace Treg není

schopná IL-2 sama produkovat. Z prostředí ho vyčerpává s vysokou afinitou. IL-2 spolu s TGF- β jsou inicializačními cytokiny nezbytnými pro proliferaci Treg. Exprese CD25 je ovlivněna koncentrací IL-2 v prostředí a je nezbytná pro expresi Foxp3 (Saito et al. 2013). K expresi CD25 dochází také např. na aktivovaných T lymfocytech nebo endoteliálních buňkách (Boyman and Sprent 2012).



Obrázek 8 Receptor pro Interleukin 2 na T regulačních lymfocytech

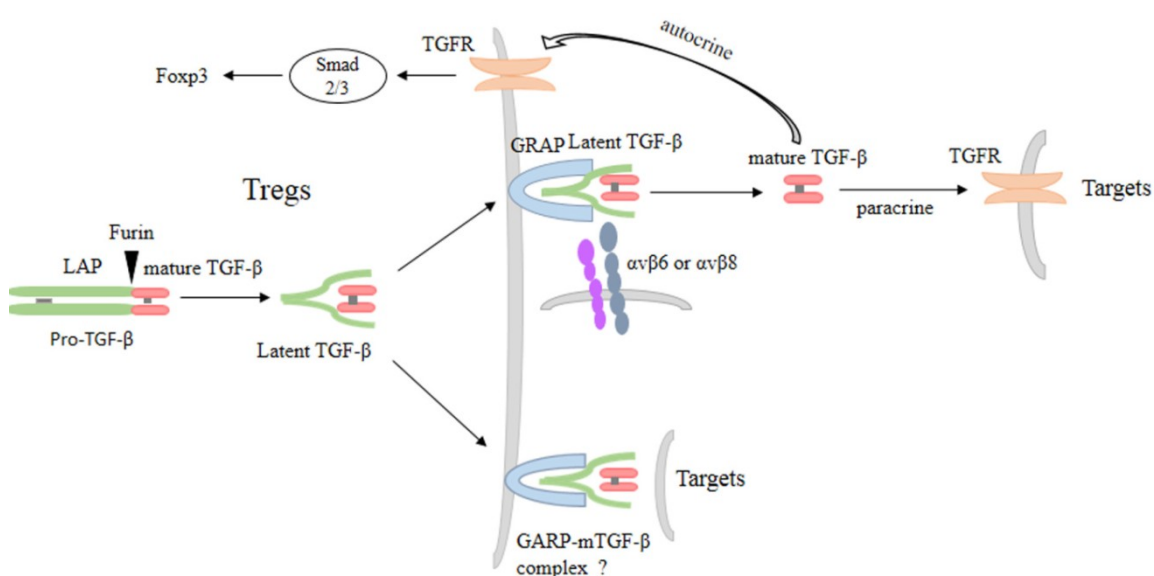
IL-2 je jedním ze dvou zásadních cytokinů, který se podílí na iniciaci proliferace populace Treg. STAT5 (STAT5 - Signal transducer and activator of transcription 5), Foxp3 (Foxp3 - Forkhead box P3). Převzato a upraveno (Boyman and Sprent 2012).

Molekula CD127 je povrchový řetězec receptorového dimeru I. typu se společným γ řetězcem pro vazbu IL-7. Efektorové T lymfocyty mají vysokou expresi CD127. Pro Treg je typická nízká míra exprese CD127, popř. k expresi vůbec nedochází (Balandya et al. 2012).

Helios je transkripční faktor patřící do rodiny Ikaros. Tento transkripční faktor neovlivňuje regulační vlastnosti Treg. Jeho funkce není přesně definována, pravděpodobně se podílí na diferenciaci některých subtypů T lymfocytů. Transkripční faktor Helios je považován za jeden z možných diferenciačních markerů sloužících k rozlišení populací nTreg a iTreg. Je exprimován zejména na populaci Treg, která byla diferencována v procesu selekce

autoreaktivních T lymfocytů v thymu – nTreg. U populace Treg diferencovaných pod vlivem cytokinového prostředí k jeho expresi nedochází (Thornton et al. 2015).

GARP (GARP - Glycoprotein A repetitions predominant) nebo také LRRC3 (LRRC3 - Leucine rich repeat containing 3) je transmembránový protein – v extracelulární oblasti bohatý na leucin. Jeho vysoká exprese byla zaznamenána na trombocytech a aktivovaných Treg. Slouží jako receptor pro latentní komplex TGF- β . Tento komplex zůstává ukotvený na membráně. Exprese GARP není závislá na Foxp3, ale koreluje s jejich regulační aktivitou, viz Obrázek 9. Vysoká exprese GARP na Treg byla zjištěna na myších modelech na různých typech buněk během embryogeneze (Tran et al. 2009).



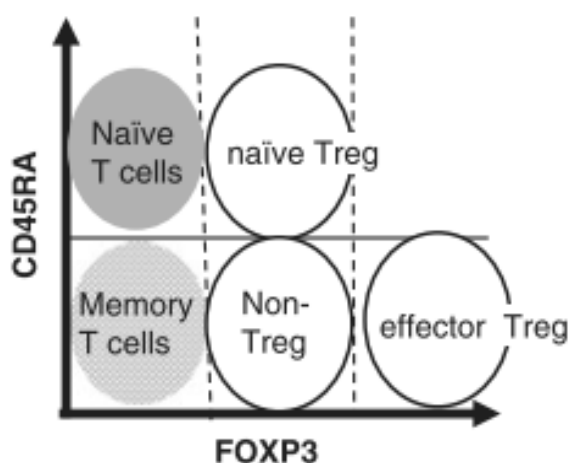
Obrázek 9 Schéma znázorňující funkci GARP a jeho kooperace s TGF- β .

TGF- β (TGF- β - Transforming growth factor β) je syntetizován v podobě Pro-TGF- β prekursoru. Jedná se o homodimer složený z molekuly LAP (LAP - Latency-associated peptide) a zralého TGF- β . Pro-TGF- β prekursor je štěpen enzymem furinem za vzniku komplexu latentního TGF- β , ve kterém je zralý TGF- β nekovalentně vázán na LAP. Membránový protein GARP (GARP - Glycoprotein A repetitions predominant), ukotvený v membráně je přenašečem a zároveň ukotvuje komplex latentního TGF- β na povrchu Treg (Treg - Regulatory T cell). Uvolnění zralého TGF- β z kotvy, kterou je GARP, dochází působením integrinů. TGF- β pak působí autokrinně a spolu s IL-2 jsou zásadními cytokiny ovlivňující expresi Foxp3, popř. může docházet k parakrinnímu působení po vazbě na příslušný receptor cílové buňky. Uvažuje se i o možnosti, kdy navázaný komplex latentního TGF- β na molekulu GARP propůjčuje Treg schopnost suprese přímým kontaktem. Převzato a upraveno (Sun, Jin, and Li 2016a).

PTPRC (PTPRC - Protein tyrosine phosphatase, receptor type C), označována jako molekula CD45, dříve známá pod názvem LCA (LCA - leukocyte common antigen) je člen rodiny PTP

(PTP - Protein tyrosine phosphatase). Zásadní funkce PTP je signalizace řady buněčných procesů. CD45 je transmembránový silně glykosylovaný protein, který je v různých formách přítomný na všech diferencovaných hematopoetických buňkách, s výjimkou erytrocytů a plazmatických buněk (Baldwin and Ostergaard 2000).

Rodina CD45 sestává z izoform CD45RA, CD45RB a CD45RC, které jsou odrazem funkční zralosti Treg. K expresi CD45RA dochází na naivních Treg, u efektorových Treg k expresi této molekuly nedochází (Saito et al. 2013a), viz Obrázek 10



Obrázek 10 Závislost exprese CD45RA a Foxp3 na různých aktivačních stádiích populací T regulačních lymfocytů.

Populace CD4⁺ lymfocytů bez exprese Foxp3 (Foxp3 - Forkhead box P3) a s nízkou expresí CD45RA je populace paměťových T lymfocytů, stejná skupina buněk s vysokou mírou exprese CD45RA je populace naivních T lymfocytů. Treg (Treg - Regulatory T cell) s nižší mírou exprese Foxp3 a s vysokou mírou exprese CD45RA je populací naivních Treg. Populace s vysokou mírou exprese Foxp3 a nízkou expresí CD45RA je populace efektorových Treg. Převzato a upraveno (Saito et al. 2013b)

5 Cíle diplomové práce

Cíle diplomované práce jsou:

- 1) Sledování dynamiky tvorby subpopulací Treg a hladiny TGF- β 1 v průběhu fyziologického těhotenství.
- 2) Popis zastoupení jednotlivých subpopulací Treg ve skupině žen s příznaky hrozícího předčasného porodu (abnormální děložní kontrakce, krvácení, a/nebo ultrazvukový nález zkrácení děložního hrdla pod 15mm).
- 3) Porovnání zastoupení subpopulací Treg a sérové hladiny TGF- β 1 mezi skupinou žen s hrozícím předčasným porodem a žen s fyziologicky probíhající graviditou.
- 4) Porovnání stanovení základní populace Treg značené pouze povrchovým značením (CD4,CD45,CD25,CD127), běžně vyžívaným při stanovování Treg v rutinní praxi, se stejným povrchovým značením a použitím intracelulárního značení transkripčního faktoru Foxp3.

6 Použité metody

Pro stanovení fenotypu Treg bude použita metoda mnohobarevné průtokové cytometrie. Hladina TGF- β 1 bude stanovena metodou ELISA za použití soupravy firmy R&D Systems (USA, Kanada) Quantikine® ELISA Human TGF- β 1.

6.1 Princip metody ELISA

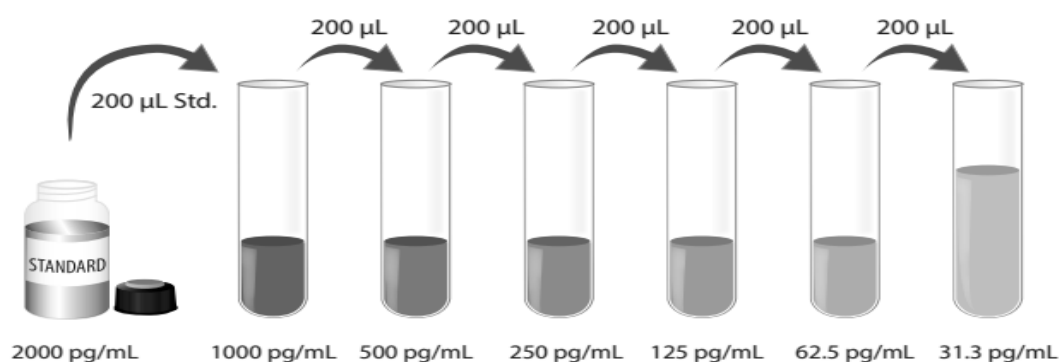
Princip ELISA metod je založen na vazbě analytu a jejího ligandu (interakce antigen-protilátka). Na pevné fázi, nejčastěji dně jamek mikrotitrační destičky, je navázaný ligand schopný specifické vazby analytu. Po přidání vzorku dochází ke specifické vazbě stanovovaného analytu na ligand. Po odmytí kapalné fáze je do jamek přidán konjugát – protilátka proti analytu s navázaným enzymem. Po jeho vazbě na analyt (navázaný na ligand na dně destičky) a následném promytí je do jamek přidán enzymový substrát. Přeměnou substrátu dochází ke vzniku zabarvení, jehož intenzita odpovídající koncentraci analytu je vyhodnocena spektrofotometricky při vhodné vlnové délce.

6.1.1 Stanovení TGF- β 1 v experimentu

Pro stanovení TGF- β 1 byla použita ELISA souprava firmy R&D Systems (USA, Kanada) Quantikine® ELISA Human TGF- β 1 a bylo postupováno přesně dle protokolu výrobce. TGF- β 1 bylo stanovováno v séru, které bylo ihned po odběru centrifugováno 15 minut při 1000g, následně separováno a uchováváno při -80 °C. Kit pro stanovení TGF- β 1 je založen na principu sendvičové ELISA metody, kdy na dně destičky je navázána specifická protilátka proti lidskému TGF- β 1. Pro odečet koncentrací byla použita sedmi bodová kalibrační křivka. Výsledná hodnota odpovídá byla uvedena v pg/ml.

Vzorky sér byly rozmrazeny při pokojové teplotě. Před samotným stanovením bylo vyšetřovaná séra nutné aktivovat dle doporučení výrobce. Aktivace 40 μ l séra proběhla po přidáním 20 μ l 1N HCl následné 10 minutové inkubaci při pokojové teplotě. Následná

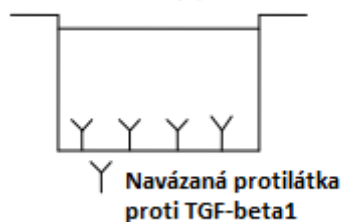
neutralizace byla provedena přidáním 20μl 1.2N NaOH/0.5M HEPES. Aktivované vzorky byly stabilní 24 hodin při teplotě 2 až 6°C. Před samotným stanovením byly rozpuštěny všechny reagensie potřebné pro provedení analýzy dle instrukcí výrobce. Pro závěrečné hodnocení naměřených hodnot byl naředěn standard na požadované koncentrace použitelné pro sestavení kalibrační křivky, viz Obrázek 11.



Obrázek 11 Ředění kalibrační křivky použité při vyhodnocení výsledných hodnot TGF-β1 metodou ELISA.

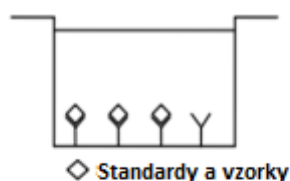
Převzato a upraveno <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/db100b.pdf>, 1.4.2016

Aktivované vzorky byly ředěny v poměru 10μl aktivovaného séra + 190μl Calibrator Diluent RD5-53.



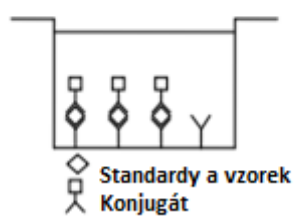
Do destičky s navázanou protilátkou proti TGF- β 1 bylo pipetováno 50 μ l Assay Diluent RD1-73 a 50 μ l aktivovaných a naředěných sér pacientů, kontrol a standardů

První inkubace



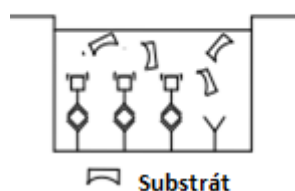
První inkubace trvala 2 hodiny při pokojové teplotě. Po skončení inkubační doby byla destička 3x promyta 400 μ l promývacího pufru

Druhá Inkubace



Před druhou inkubací bylo do jamek pipetováno 100 μ l konjugátu. Inkubace trvala 2 hodiny při pokojové teplotě. Následně byla destička 3x promyta 400 μ l promývacím pufrem.

Třetí inkubace



Před třetí inkubací bylo do jamek pipetováno 100 μ l substrátu. Inkubace trvá 30minut ve tmě. Po inkubační době je do jamky přidáno 100 μ l stopovacího roztoku. Následovalo spektrofotometrické zhodnocení

Měření bylo provedeno spektrofotometrem Elx808 od firmy BioTek Instruments, Inc. (USA) při vlnové délce 450nm s korelací 640nm. Výsledné hodnoty byly přepočteny dle naměřené vlnové délky jednotlivých analytů v závislosti na kalibrační křivce.

6.2 Princip průtoková cytometrie

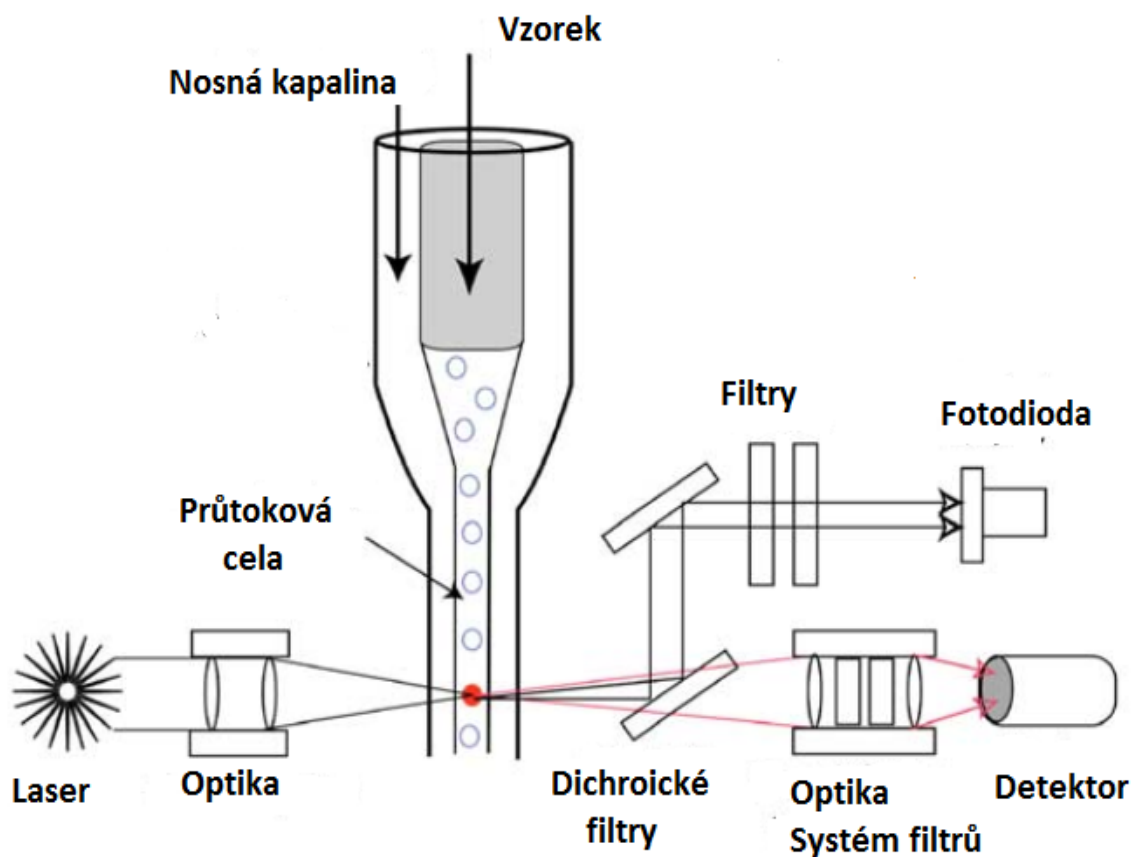
Průtoková cytometrie je analytická metoda, která využívá měřitelné rozdíly v optických vlastnostech částic při průchodu a ozáření světelným paprskem. Hlavními měřenými parametry jsou tzv. přímý resp. boční rozptyl, které odpovídají velikosti resp. vnitřní složitosti buněk (množství buněčných inkluzí a granul, atd.). Pro detailnější analýzu se k identifikaci povrchových nebo intracelulárních antigenů buněk využívají specifické monoklonální protilátky, označené různými fluorescenčními molekulami. Měřeným signálem je pak jejich fluorescence.

Přímý rozptyl – FSC (FSC – forward scatter) – je detekován pomocí diodového detektoru ve směru excitačního laserového paprsku v úhlu cca 10° od jeho osy. Boční rozptyl – SSC (SSC – side scatter), je světlo odražené na buňkách, které je detekováno v úhlu 90° od osy laserového paprsku, viz Obrázek 12. Fluorescence představuje světlo, které je po excitaci laserem emitované fluorescenčními značkami. Fluorescenční signál je zpracován pomocí sestavy dichroických zrcadel, filtrů a čoček. Při zpracování dochází k rozložení signálu/paprsku podle vlnové délky tak, že jednotlivé části odpovídají vlnové délce světla emitovaného fluorescenčními značkami. Signál je následně měřen pomocí fotonásobičových detektorů. V průtokové cytometrii tak lze s velkou výhodou použít značení částic pomocí protilátek s různými fluorescenčními značkami, a tím stanovit velké množství parametrů jedné buňky najednou.

Pro správnou analýzu je nezbytné, aby měřené buňky procházely systémem konstantní rychlostí jedna za druhou. To je zajištěno tzv. hydrodynamickou fokusací, kdy je suspenze buněk ze vzorku pro přivedení do průtokové cely unášena proudem nosné kapaliny. Vstřik vzorku pod tlakem do proudícího pláště nosné kapaliny podporuje oddělení buněk v proudu. Analyzované buňky jsou tak udržovány v jeho úzké centrální části, čímž je umožněna jejich optimální analýza (Wang et al. 2010).

Výsledky cytometrické analýzy jsou zpravidla vydávány v číselné i grafické formě. Grafickou formu představují jednoparametrové histogramy nebo dvouparametrové bodové grafy, které v dvourozměrném prostoru znázorňují jednotlivé buňky v závislosti na intenzitě signálu vybraných parametrů. Číselným výsledkem je relativní – procentuální – zastoupení buněk

v rámci zvolené populace, které může být doplněno hodnotami absolutními – počty buněk na objemovou jednotku. V dnešní době je s rozvojem vyhodnocovací techniky u mnohobarevné průtokové cytometrie možné zobrazování výsledků i ve vícerozměrném prostoru, popřípadě i jinými způsoby pomocí speciálních softwarových algoritmů.



Obrázek 12 Schéma průtokového cytometru.

Průtoková cytometrie zaznamenává měřitelné rozdíly v optických vlastnostech částic při průchodu a ozáření světelným paprskem. Měřenými parametry jsou tzv. přímý resp. boční rozptyl, které odpovídají velikosti resp. vnitřní složitosti buněk (množství buněčných inkluzí a granul, atd.). Měřené buňky procházejí systémem konstantní rychlostí, což je zajištěno tzv. hydrodynamickou fokusací. Signál je následně měřen pomocí fotonásobičových detektorů.

Převzato a upraveno <http://femsec.oxfordjournals.org/content/femsec/49/1/37.full.pdf>, 1.4.2017

6.2.1 Použití průtokové cytometrie v experimentu

Pro náš experiment byl pro průtokovou cytometrii sestaven mnohobarevný panel, identifikující jednotlivé povrchové i intracelulární znaky subpopulací Treg. Značení jednotlivých markerů bylo provedeno monoklonálními protilátkami, viz. Tabulka 3. Panel byl měřen na průtokovém cytometru Navios a data byla vyhodnocena v programu Kaluza 5.1. (oboje od Beckman Coulter, USA).

Tabulka 3 Využití jednotlivých kanálů průtokového cytometru, sledované parametry, jejich značení a výrobce monoklonálních protilátek.

Kanál	Znak	Značení	Výrobce
FL1	CD45RA	FITC	Beckman Coulter
FL2	CD25	PE	Beckman Coulter
FL3	GARP	PE-eFluor610	eBioscience
FL5	CD127	PC7	Beckman Coulter
FL6	Foxp3	eFluor660	eBioscience
FL7	CD4	Alexa Fluor 700	eBioscience
FL8	PD-1	APC-eFluor 780	eBioscience
FL9	Helios	eFluor 450	eBioscience
FL10	CD45	Krome Orange	Beckman Coulter

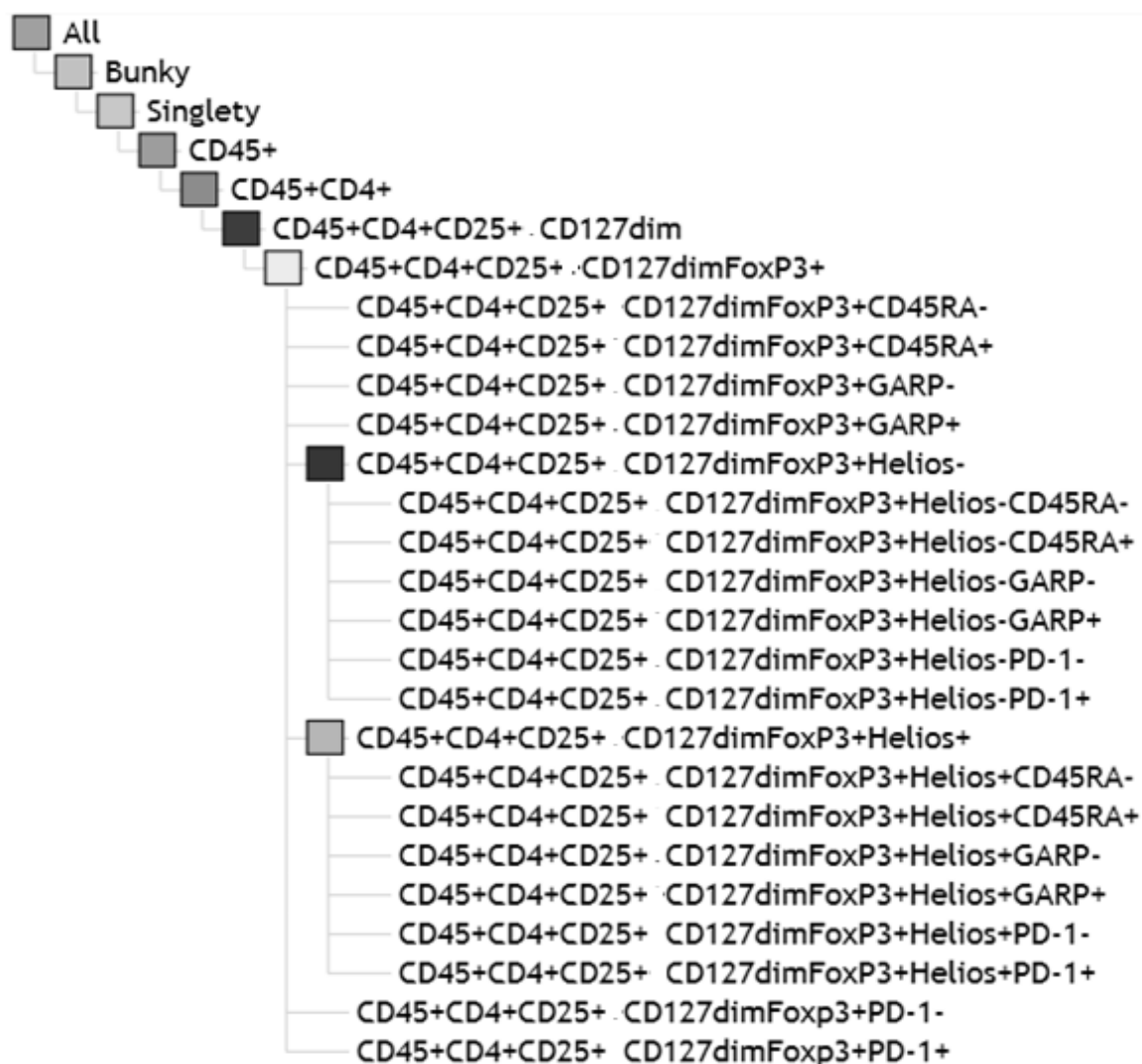
Pro zjištění vhodné koncentrace monoklonálních protilátek byla provedena jejich titrace viz. Tabulka 4. Vyhodnocení bylo provedeno dle mediánu intenzity fluorescence a byla zjištěna saturační koncentrace pro použití v experimentu.

Tabulka 4 Výsledné ředění jednotlivých monoklonálních protilátek použitých v experimentu.

Znak	Značení	Ředění do analýzy
CD45RA	FITC	bez ředění
CD25	PE	bez ředění
GARP	PE-eFluor610	bez ředění
CD127	PC7	1:2
Foxp3	eFluor660	bez ředění
CD4	Alexa Fluor 700	1:2
PD-1	APC-eFluor 780	bez ředění
Helios	eFluor 450	bez ředění
CD45	Krome Orange	1:2

Korekce přesvitu (kompenzace) byla provedena na základě měření kompenzačních SS zkumavek (SS – single stain) použitím kuliček OneComp eBeads (eBioscience, USA). Na podkladě měření FMO (FMO- Fluorescence Minus One) zkumavek byly stanoveny hranice positivity a negativity jednotlivých stanovovaných populací. Před každým měřením byly stanoveny a hodnoceny výsledky kalibračních kuliček Flow-Check pro Fluorospheres (Beckman Coulter, USA) pro ověření stability analytického systému. Během měření proběhla kontrola síly signálu v čase. Gatovací strategie je popsána v Tabulce 5.

Tabulka 5 Gatovací strategie použitá v experimentu



Hodnoty zastoupení jednotlivých subpopulací Treg byly vyhodnoceny v programu Kaluza 5.1. (Beckman Coulter, USA). Do statistického zpracování byly relativní počty buněk převedeny do formy jejich absolutního zastoupení. Absolutní hodnoty byly vypočteny pomocí hodnot absolutního počtu lymfocytů z krevního obrazu, měřených na automatickém analyzátoru firmy Sysmex® XN-1000 (Sysmex, Japonsko).

Pro analýzu byl použit vzorek plné krve odebrané do zkumavky Vacutainer® s protisrážlivým činidlem EDTA. Ke zpracování došlo do 4 hodin od odběru. V průběhu analýzy byl vzorek chráněn před přímým světlem.

Pracovní postup sestavený pro značení subpopulací Treg byl následovný:

1. 100μl plné krve + 5μl monoklonálních protilátek v pracovním ředění určených pro povrchové značení:
 - anti-CD45 Krome Orange (Beckman Coulter,USA),
 - anti-CD4 Alexa Fluor 700 (eBioscience,USA),
 - anti-CD25 PE (Beckman Coulter,USA),
 - anti-CD127 PC7 (Beckman Coulter,USA)
 - anti-CD45RA FITC (Beckman Coulter,USA),
 - anti-CD279 (PD-1) APC-eFluor 780 (eBioscience,USA),
 - anti-GARP PE-eFluor 610 (eBioscience,USA),
2. Inkubovat 30 minut při 4 – 8°C
3. Lýza 100μl lyzačního roztoku EXCELLYSE I (Exbio,CZ) po dobu 5 minut při laboratorní teplotě bez přístupu světla
4. Přidat 1ml deionizované H₂O a inkubovat 5 minut při laboratorní teplotě
5. Centrifugovat 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant,
6. Přidat 1,5ml PBS (BD Biosciences, USA)
7. Centrifugovat 5 minut 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant,
8. Přidat 1ml Fixačního/Permeabilizačního roztoku v pracovním ředění (Foxp3/Transcription factor Staining Buffer, eBioscience,USA) a inkubovat 30 minut při 4°C
9. Přidat 1ml Permeabilizačního roztoku v pracovním ředění (Foxp3/Transcription factor Staining Buffer, eBioscience,USA)
10. Centrifugovat 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant,
11. Promýt v 1ml Permeabilizačního roztoku
12. Centrifugovat 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant,
13. Přidat po 5μl monoklonálních protilátek
 - anti-Foxp3 eFluor 660 (eBioscience,USA)
 - anti-Helios eFluor 450 (eBioscience,USA)
14. Inkubace 30 minut při 4 – 8°C bez přístupu světla
15. Promýt v 1ml Permeabilizačního roztoku,

16. Centrifugovat 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant
17. Promýt v 1ml Permeabilizačního roztoku
18. Centrifugovat 5 minut/400g při 4°C – slít supernatant
19. Resuspendovat peletu ve 200μl PBS

7 Analýza výsledků

7.1 Charakteristika vyšetřovaných skupin žen

Studie byla provedena mezi roky 2016 a 2017 a byla schváleno Etickou komisí 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Ženy podepsaly informovaný souhlas o zařazení do studie a byly řádně poučeny o průběhu studie. K laboratornímu vyšetření byla použita plná krev, odebraná do zkumavky Vacutainer[®] s protisrážlivým činidlem EDTA. Krev srážlivá byla odebraná do zkumavky Vacutainer[®]. Oba typy krevních vzorků byly odebrány z kubitální žíly.

První skupinu tvořily těhotné zdravé ženy (n=22). Tyto ženy byly ve věku 26 až 38 let (průměrný věk 33let). Do studie byly zařazeny na základě pohovoru týkajícího se jejich zdravotního stavu. Zásadní podmínkou pro zařazení do studie bylo zdraví ženy před započatým těhotenstvím a během časných fází těhotenství. U těchto žen nebylo diagnostikováno žádné závažné onemocnění typu:

1. neléčená a/nebo dekompenzovaná alergie – atopie, astma
2. autoimunitní onemocnění – systémový lupus erythematoses, revmatoidní artritida, antifosfolipidový syndrom, roztroušená skleróza atd.
3. nádorové onemocnění

Odběry krve byly ženám prováděny dle následujícího schématu:

1. V období 8. až 12. týdne těhotenství (n=22)
2. V období 20. až 25. týdne těhotenství (n=18)
3. V období mezi 30. až 35. týdnem těhotenství (n=18)
4. Při porodu (n=14)

V minoritní skupině žen (n=3) byla v průběhu těhotenství diagnostikována PE. Těhotenství ostatních sledovaných žen probíhalo fyziologicky, bez komplikací, diagnostikovaných vývojových vad a růstových nebo jiných retardací plodu. Porody proběhly po 35. týdnu těhotenství bez vážnějších komplikací.

Do druhé skupiny byly zařazeny ženy (n=27) ve věku 27 až 41 let (průměrný věk 35let) ve 21. až 32. týdnu těhotenství (medián 28.týden těhotenství), které se dostavily do ambulance pro riziková a patologická těhotenství Gynekologicko-porodnické kliniky VFN a 1.LF UK a nebo již rovnou k hospitalizaci na tuto kliniku s příznaky hrozícího předčasného porodu (abnormální děložní kontrakce, krvácení, a/nebo ultrazvukový nález zkrácení děložního hrdla menší než 15mm a méně). Všechny pacientky byly vyšetřeny transvaginálním ultrazvukem k posouzení délky a stavu uzavřenosti děložního hrdla.

V této skupině se vyselektovaly ženy (n=19), které porodily předčasně před ukončeným 34. týdnem těhotenství. Jednalo se o tzv. "early preterm" porod. Zbylé pacientky (n=8) i přes nepříznivou prognózu porodily po ukončeném 34. týdnu těhotenství a ze statistického zhodnocení dat byly vyřazeny.

Do kontrolní skupiny byly zařazeny zdravé těhotné ženy (n=27) v odpovídajícím týdnu těhotenství mezi 20. až 35. týdnem těhotenství ve věku 22 až 38 let (průměrný věk 33 let), které porodily po 35. týdnu těhotenství, u kterých nebyl diagnostikován žádný z příznaků hrozícího porodu. Ze základní popisné charakteristiky skupiny vyšetřených pacientek vyplývá, že vyšetřené pacientky se nelišily s ohledem na věk a že byly vyšetřeny ve stejných fázích těhotenství.

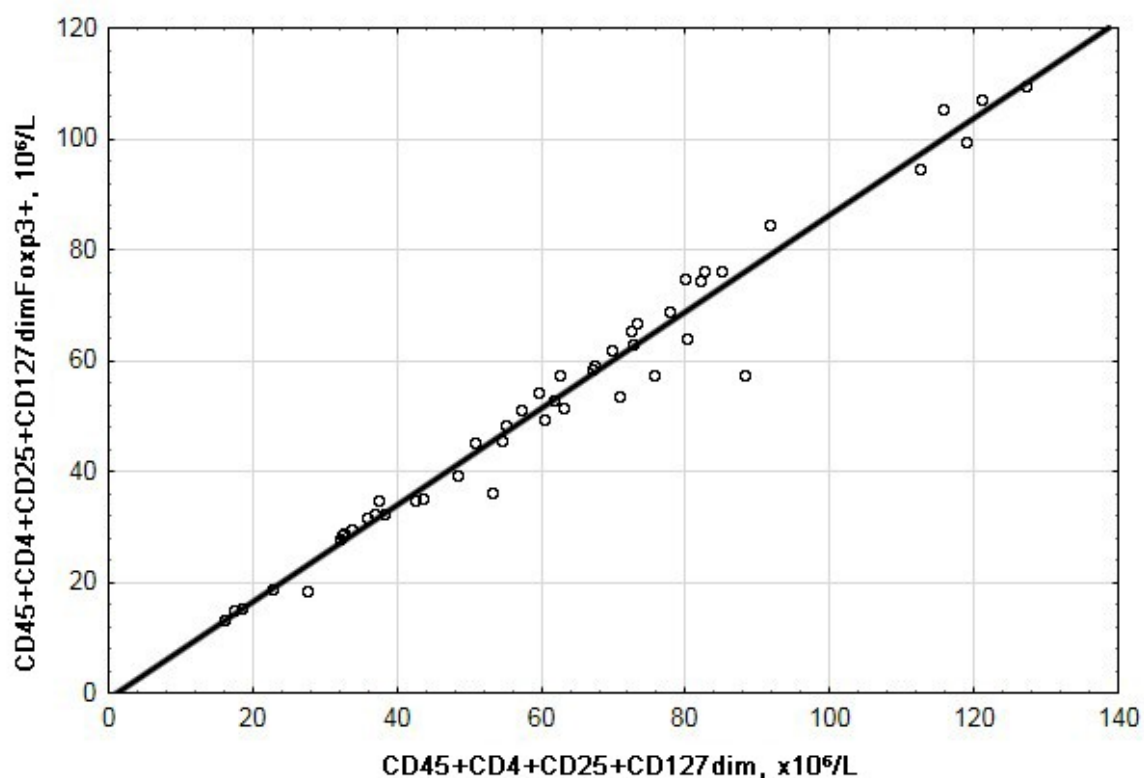
7.2 Statistické zhodnocení dat

Statistická analýza dat byla provedena pomocí softwaru STATISTICA CZ 12.0 (Statsoft, USA). V deskriptivní statistice jsou jako míry polohy spojitých proměnných uváděny medián a interkvartilové rozmezí. S ohledem na charakter a rozsah souboru byly k analýzám použity neparametrické testy - k analýze rozptylu Kruskal-Wallisův test a k testování shody rozdělení dvou výběrů Mann-Whitneyův test, oba na hladině významnosti $p < 0,05$. Ke zjištění korelace mezi koncentracemi měřených veličin byl použit Spearmanův korelační koeficient na hladině významnosti $p < 0,05$.

8 Výsledky experimentu

8.1 Optimální značení T regulačních lymfocytů v klinické praxi

Jedním z vytýčených cílů bylo definovat optimální způsob imunofenotypizace populace Treg, který by byl vhodný pro rutinní použití v klinických laboratořích. Za jasný identifikační znak velmi heterogenní populace Treg je standardně považován transkripční faktor Foxp3, který je nezbytný k proliferaci a k plnění regulačních funkcí této buněčné populace. Značení tohoto intracelulárního markeru je však časově i metodicky náročné. V rutinní laboratorní praxi se proto více vžilo využití znaku CD127 jako vhodného povrchového markeru Treg. Před zahájením všech cytometrických analýz byla proto provedena analýza korelace absolutních hodnot populace Treg značených jako $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ s hodnotami populace Treg značenými jako $CD45^+CD4^+Foxp3^+$. Počty Treg zjištěné oběma metodami vykazovaly velmi těsnou pozitivní korelaci ($p < 0,00001$), viz Graf 1.



CD45+CD4+CD25+CD127dim, $\times 10^6/L$:Treg+, $\times 10^6/L$: $y = -0,9883 + 0,874 \cdot x$; $r = 0,9847$; $p < 0,00001$;
 $r^2 = 0,9696$

Graf 1 Korelace absolutních počtů T regulačních lymfocytů fenotypu $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ s populací $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$

8.2 Dynamika tvorby subpopulací T regulačních lymfocytů a TGF-β1 v těhotenství

Dalším z cílů našeho experimentu bylo sledovat indukci tvorby subpopulací Treg a hladin TGF-β1 v průběhu fyziologického těhotenství. Pro lepší orientaci je souhrn tendence tvorby jednotlivých subpopulací Treg s fenotypem CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺ a TGF-β1 shrnut v Tabulce 6.

Ve sledované populaci zdravých těhotných žen byla v III. trimestru u třech žen diagnostikována PE, ačkoliv se jedná o velmi malou, statisticky nevýznamnou skupinu, byla do grafů dynamiky tvorby jednotlivých subpopulací zahrnuta.

Ze sledovaných subpopulací T regulačních lymfocytů v průběhu gravidity byly nalezeny signifikantní změny v absolutních počtech buněk v těchto podskupinách:

- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺PD-1⁺
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁺PD-1⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios-PD-1⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁻CD45RA⁺.

U ostatních subpopulací k výraznějším změnám dynamiky tvorby v průběhu těhotenství nedošlo. Signifikantní změny byly nalezeny také u sérové koncentrace cytokinu TGF-β1.

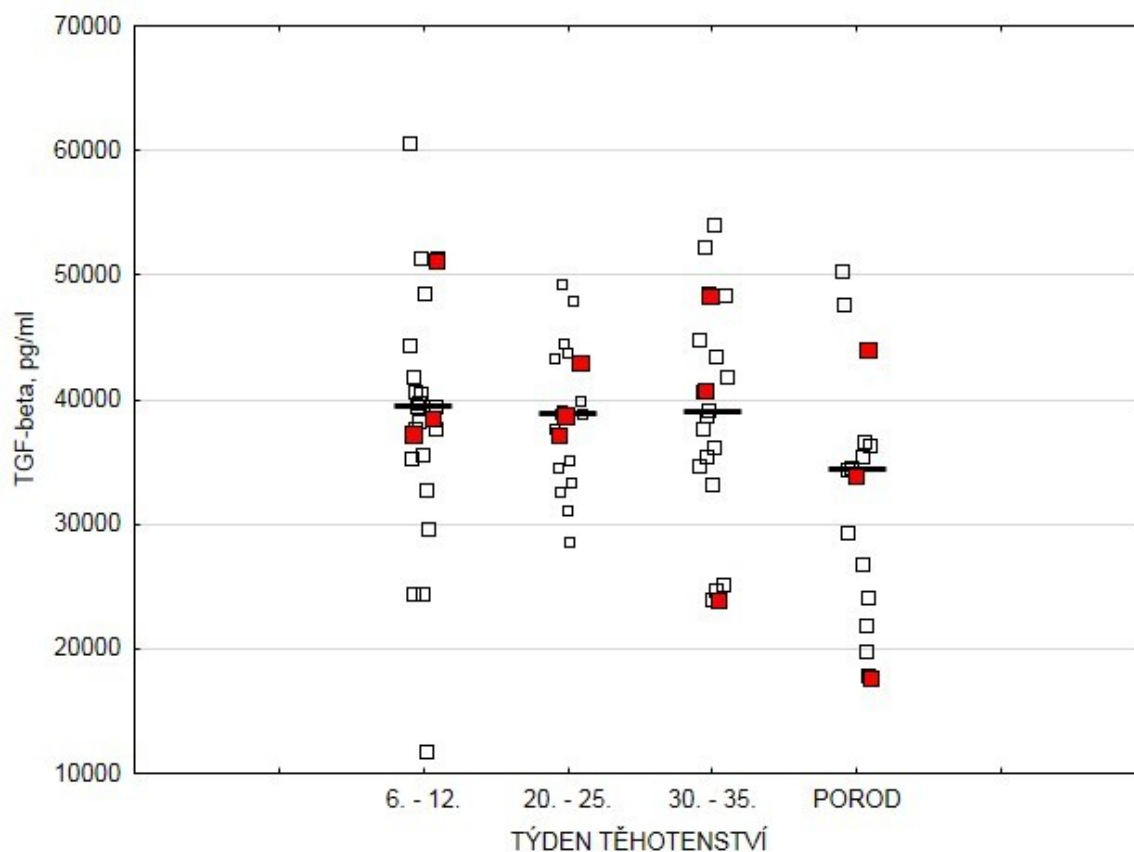
Tabulka 6 Trend tvorby subpopulací T regulačních lymfocytů v těhotenství

	6. až 12. týden těhotenství (n=22)	20. až 25. týden těhotenství (n=18)	30. až 35. týden těhotenství (n=18)	Porod (n=15)
TGF-β1	→	→	→	↓
Treg+ Abs	→	→	→	↓
Treg+CD45RA- Abs	→	→	→	→
Treg+CD45RA+Abs	→	→	→	→
Treg+GARP-Abs	→	→	→	→
Treg+GARP+Abs	→	→	→	→
Treg+PD-1-Abs.	→	→	→	→
Treg+PD-1+Abs.	→	→	↓	↓
Treg+Helios-Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios+Abs.	→	→	→	↓
Treg+Helios+CD45RA- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios+CD45RA +Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios+GARP- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios+GARP+A bs.	→	→	→	→
Treg+Helios+PD-1- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios+PD-1 +Abs.	→	→	↓	↓
Treg+Helios-CD45RA- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios- CD45RA+Abs.	↓	↑	→	↓
Treg+Helios-GARP- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios-GARP+Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios-PD-1- Abs.	→	→	→	→
Treg+Helios-PD-1 +Abs.	↑	↓	↓	↓

Trend tvorby subpopulací T regulačních lymfocytů s fenotypem CD45+CD4+CD25+CD127^{dim}Foxp3+, s expresí znaků typických pro jednotlivé typy subpopulací a sérové koncentrace TGF-β1 u žen s fyziologickým průběhem těhotenství.

TGF-β1 - Transforming growth factor β1

Signifikantní změny byly nalezeny u hladin TGF- β 1 ve sledovaných obdobích v průběhu fyziologického těhotenství. Zatímco v prvních třech sledovaných obdobích – tedy v období mezi 6. až 35. týdnem těhotenství - se jeho hladina neměnila, v období porodu dochází k poklesu sérové koncentrace TGF- β 1, viz Graf 2.

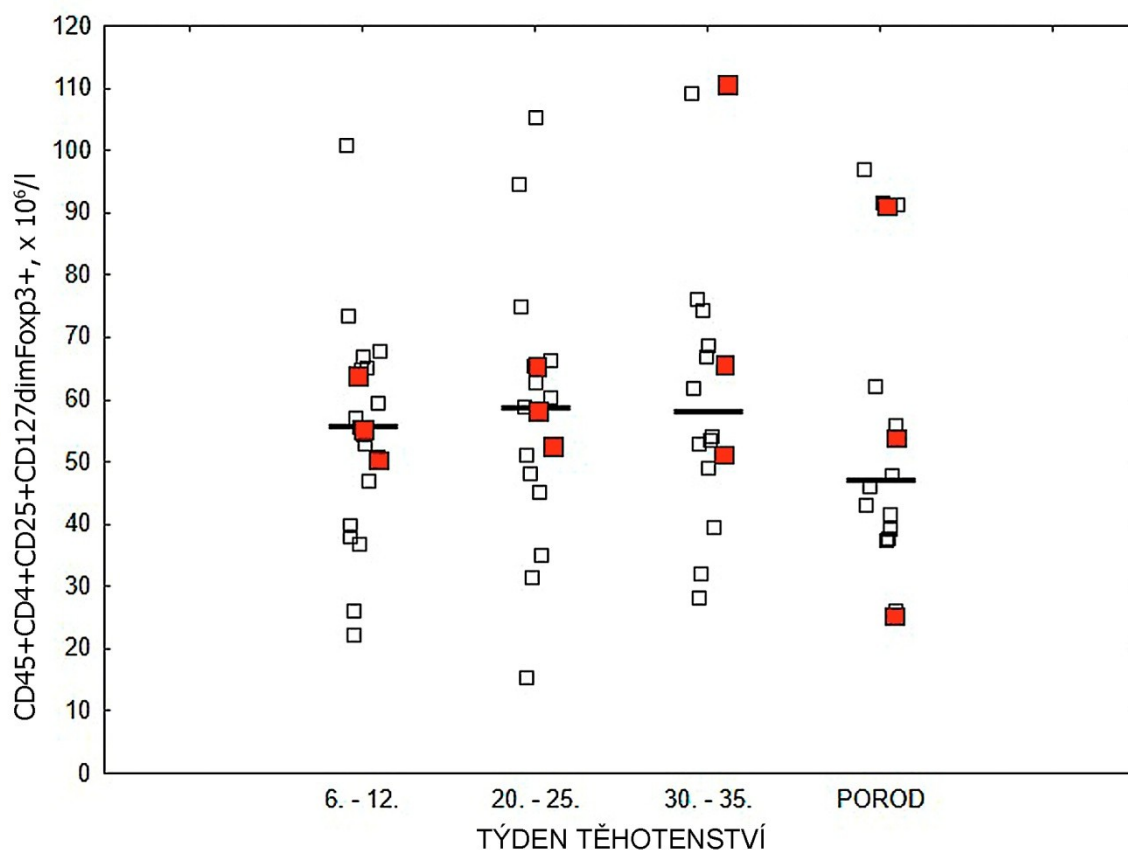


Graf 2 Sérové hladiny TGF- β 1 v pg na ml v průběhu těhotenství.

TGFbeta - Transforming growth factor β 1

- Zdravé těhotné ženy - Skupina 6.-12. týden těhotenství ($n=19$), 20.-25. týden těhotenství ($n=15$), 30.-35. týden těhotenství ($n=15$), porod ($n=11$).
- Ženy s diagnostikovanou preeklampií ($n=3$)

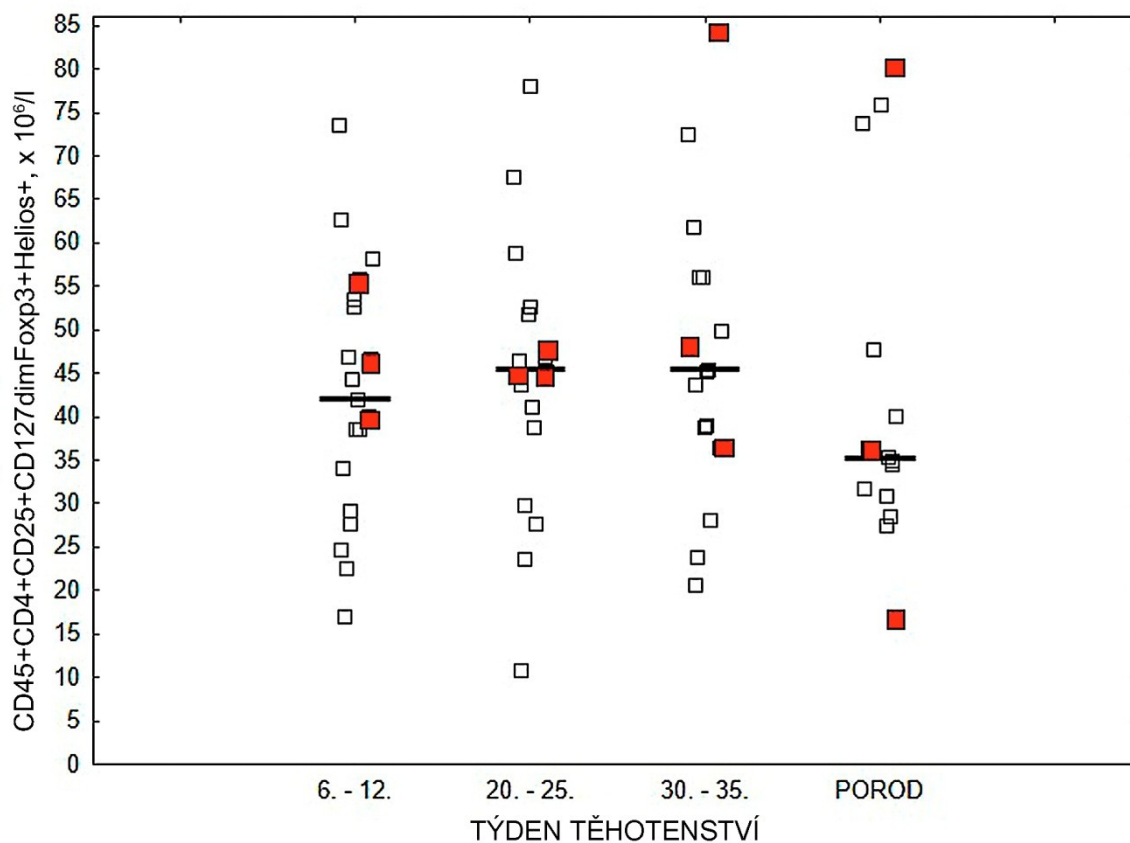
Jednou z populací, u které se v průběhu fyziologického těhotenství objevila signifikantní změna dynamiky tvorby, je populace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$. U této populace je patrné její stabilní zastoupení mezi 6. až 35. týdnem fyziologicky probíhajícího těhotenství. V období porodu dochází k poklesu zastoupení této populace v periferní krvi, viz Graf 3.



Graf 3 Zastoupení populace T regulačních lymfocytů v průběhu těhotenství.

- Zdravé těhotné ženy - Skupina 6.-12 týden těhotenství (n=19), 20.-25. týden těhotenství (n=15), 30.-35. týden těhotenství (n=15), porod (n=11).
- Ženy s diagnostikovanou preeklampií (n=3)

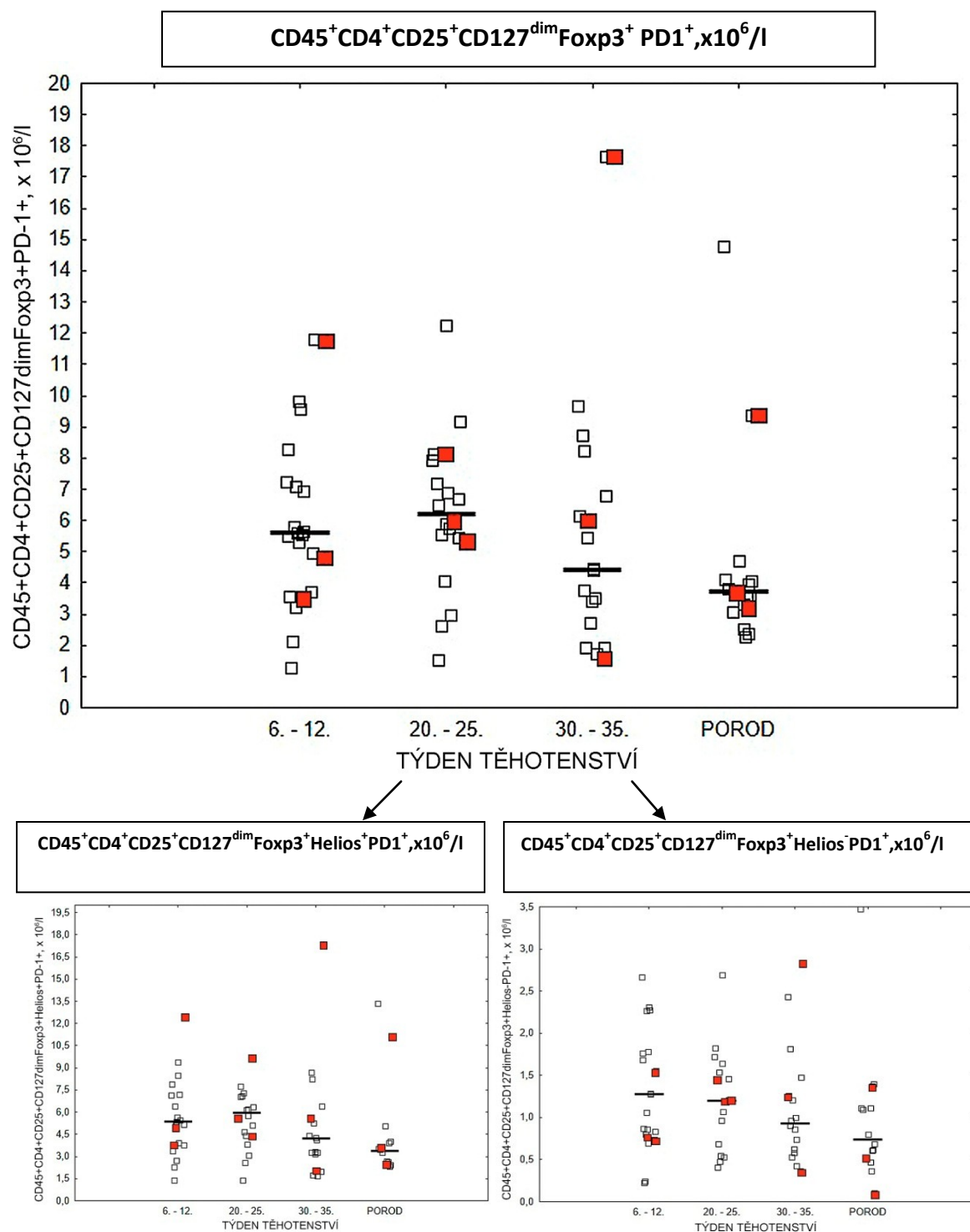
Zastoupení populace Treg odpovídající fenotypu $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$, s expresí transkripčního faktoru Helios, která je považována za diferenciační znak subpopulace nTreg, mělo v období mezi 6. až 35. týdnem mírně stoupající tendenci. V období porodu jejich zastoupení v periferní krvi klesá, viz Graf 4.



Graf 4 Zastoupení T regulačních lymfocytů s expresí transkripčního faktoru Helios v průběhu těhotenství v periferní krvi.

- Zdravé těhotné ženy - Skupina 6.-12 týden těhotenství (n=19), 20.-25. týden těhotenství (n=15), 30.-35. týden těhotenství (n=15), porod (n=11).
- Ženy s diagnostikovanou preeklampií (n=3)

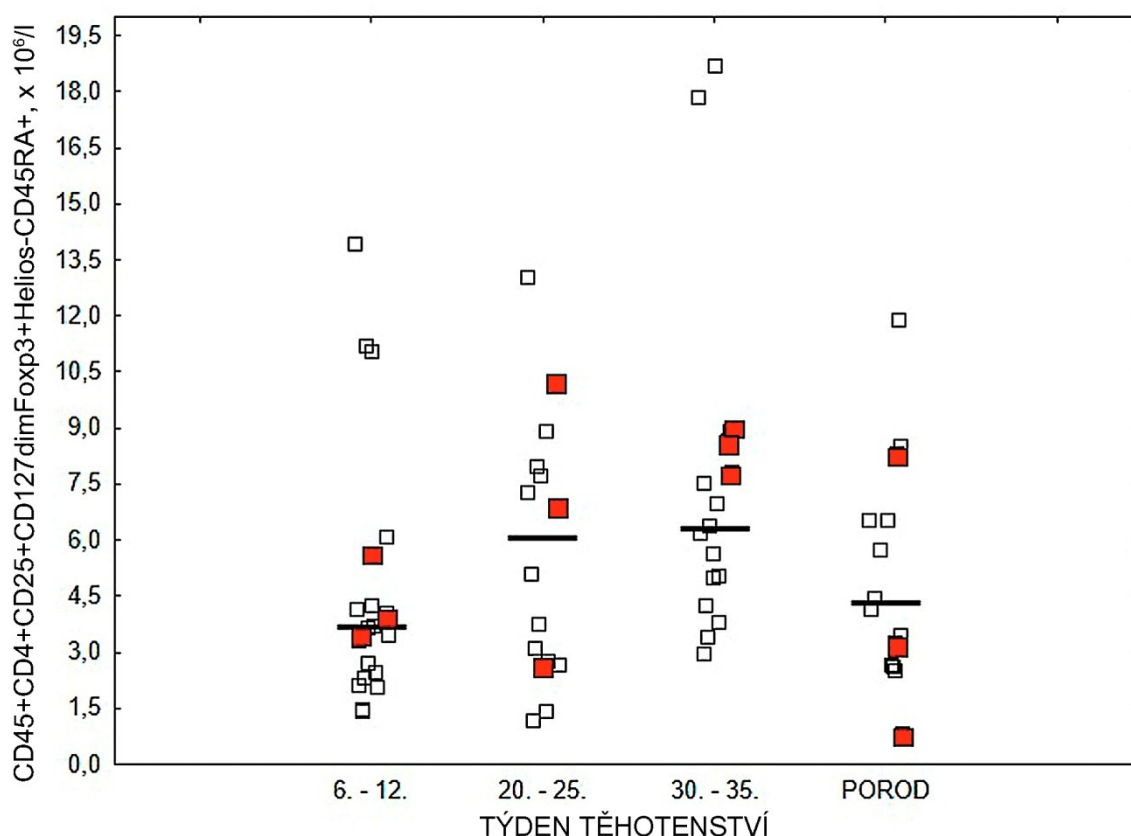
U populace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ s expresí inhibičního znaku PD1 dochází k signifikantním změnám jejich zastoupení v průběhu těhotenství. Tendence dynamických změn v průběhu těhotenství se objevily také v subpopulacích $Helios^+nTreg$ a $Helios^-iTreg$. V populaci Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+PD1^+$ dochází mezi 6. až 25. týdnem těhotenství k mírnému nárůstu jejího zastoupení v periferní krvi. V období mezi 30. až 35. týdnem těhotenství je zřetelná klesající tendence zastoupení této populace, která graduje během porodu. U populace $nTreg$ s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^+$ s expresí inhibiční molekuly PD-1 dochází ke stabilnímu zastoupení absolutních počtů této subpopulace lymfocytů v období mezi 6. až 25. týdnem těhotenství. Následně je patrná klesající tendence, která kulminuje v období porodu. K maximálnímu zastoupení subpopulace $iTreg$ s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-PD1^+$ dochází v období mezi 6. až 12. týdnem těhotenství. Následně je zřejmý trend poklesu zastoupení této populace v periferní krvi, který trvá až do porodu, viz Graf 5



Graf 5 Dynamika tvorby populace T regulačních lymfocytů s expresí inhibičního znaku PD1 u subpopulací nTreg s fenotypem CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁺PD1⁺ a iTreg s fenotypem CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁻PD1⁺ v průběhu fyziologického těhotenství.

- Zdravé těhotné ženy - Skupina 6.-12. týden těhotenství (n=19., 20.-25. týden těhotenství (n=15), 30.-35. týden těhotenství (n=15), porod (n=11)
- Ženy s diagnostikovanou preeklampií (n=3)

Zastoupení subpopulace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$, tedy populace naivních iTreg, má v období mezi 6. až 35. týdnem těhotenství vzrůstající tendenci. V období porodu dochází k poklesu zastoupení této populace v periferní krvi až na hodnotu odpovídající zastoupení této populace v období mezi 6. až 12. týdnem těhotenství, viz. Graf 6.



Graf 6 Dynamika tvorby populace T regulačních lymfocytů označovaných jako $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$ s expresí znaku $CD45RA$ v průběhu fyziologického těhotenství.

- Zdravé těhotné ženy - Skupina 6.-12. týden těhotenství (n=19), 20.-25. týden těhotenství (n=15), 30.-35. týden těhotenství (n=15), porod (n=11).
- Ženy s diagnostikovanou preeklampií (n=3)

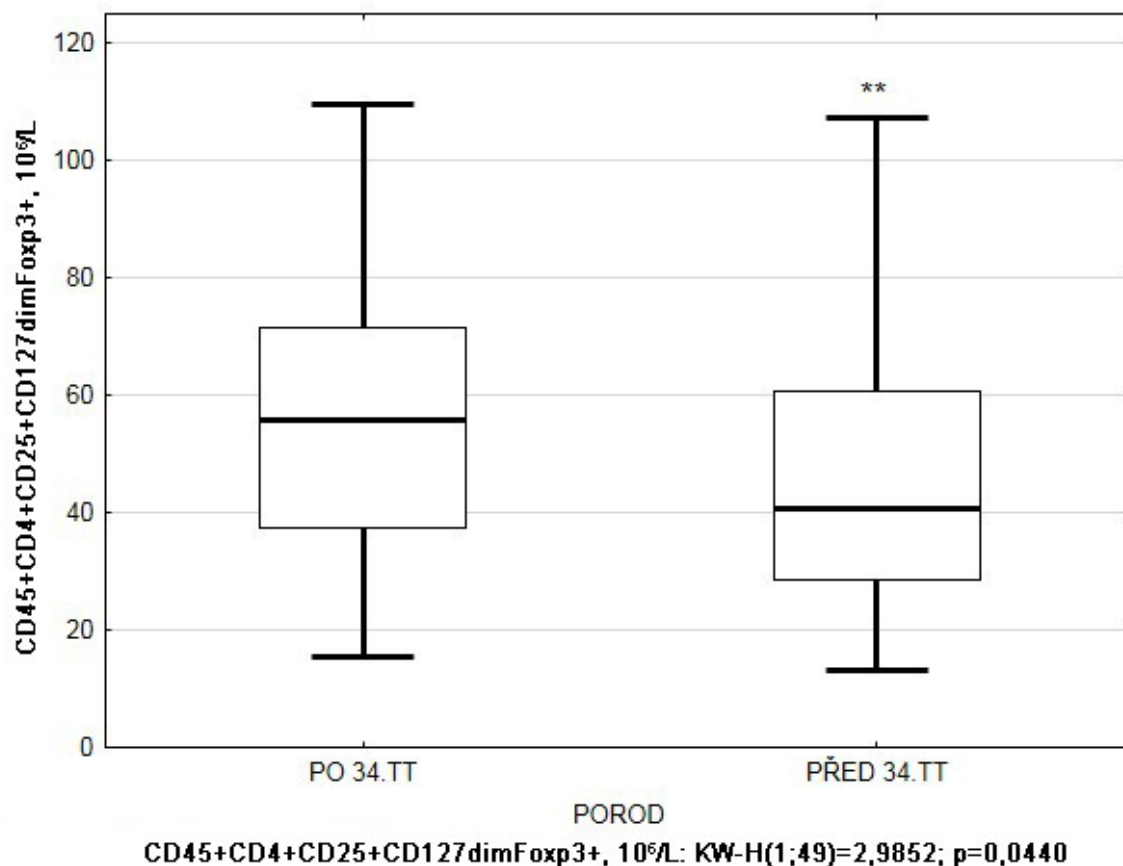
8.3 Subpopulace T regulačních lymfocytů a sérový TGF- β 1 u předčasně rodících žen

Posledním vytýčeným cílem se stalo porovnání četnosti buněčných subpopulací Treg a sérové hladiny TGF- β 1 mezi skupinami předčasně a žen v odpovídajícím termínu fyziologicky probíhajícího těhotenství, které následně porodily v termínu. Byly nalezeny signifikantní rozdíly a naznačené trendy změny absolutních počtů těchto subpopulací T regulačních lymfocytů:

- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺CD45RA⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁻CD45RA⁺,
- CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺Helios⁻GARP⁺.

K signifikantním změnám došlo u sledovaných skupin také v sérové koncentraci hladiny TGF- β 1.

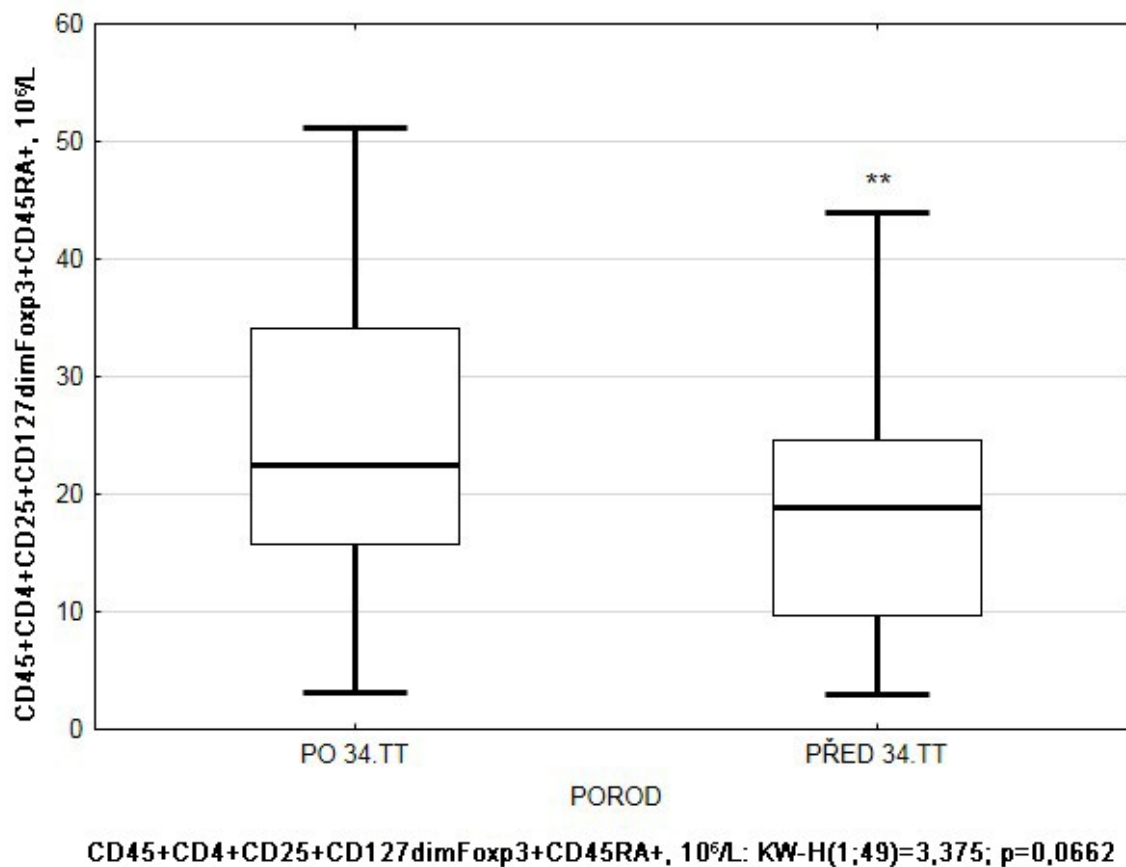
Zastoupení absolutních počtů Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ bylo ve skupině předčasně rodících žen signifikantně nižší oproti kontrolní skupině zdravých těhotných žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, které porodily po 34.týdnu těhotenství Treg ($p=0,0440$) viz Graf 7.



Graf 7 Absolutní počty populace T regulačních lymfocytů ve skupině předčasně rodících žen

Ve skupině předčasně rodících žen ($n=19$) došlo k nižšímu zastoupení počtu populace Treg než u žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, které porodily po 34. týdnu těhotenství ($n=27$).

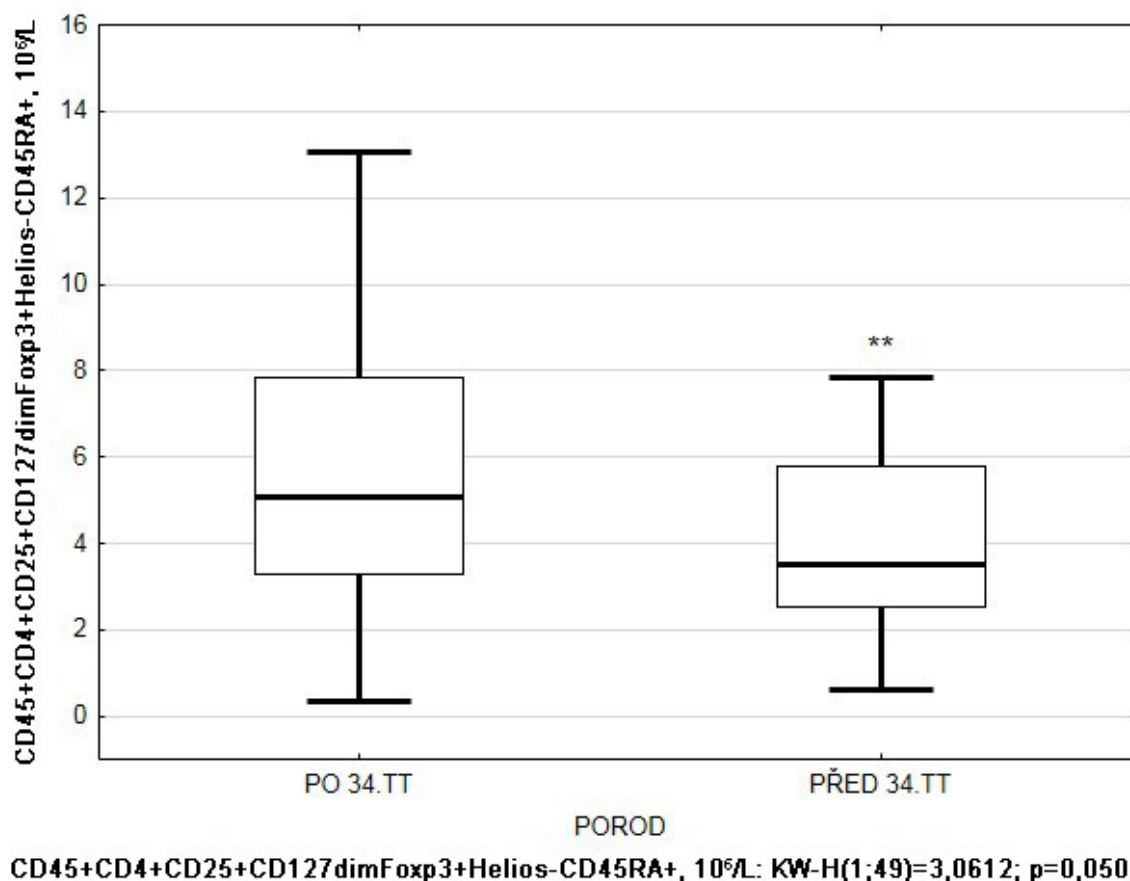
Tendence k nižším absolutním počtům u předčasně rodících žen byla nalezena v populaci popisované jako naivní Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+CD45RA^+$ ($p=0,0662$), viz. Graf 8.



Graf 8 Absolutní počty T regulačních lymfocytů s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+CD45RA^+$ u předčasně rodících žen.

Ve skupině předčasně rodících žen ($n=19$) dochází k nižšímu zastoupení této subpopulace, než je tomu u žen s fyziologicky probíhajícím těhotenstvím v odpovídajícím týdnu těhotenství, které následně porodily po 34. týdnu těhotenství ($n=27$).

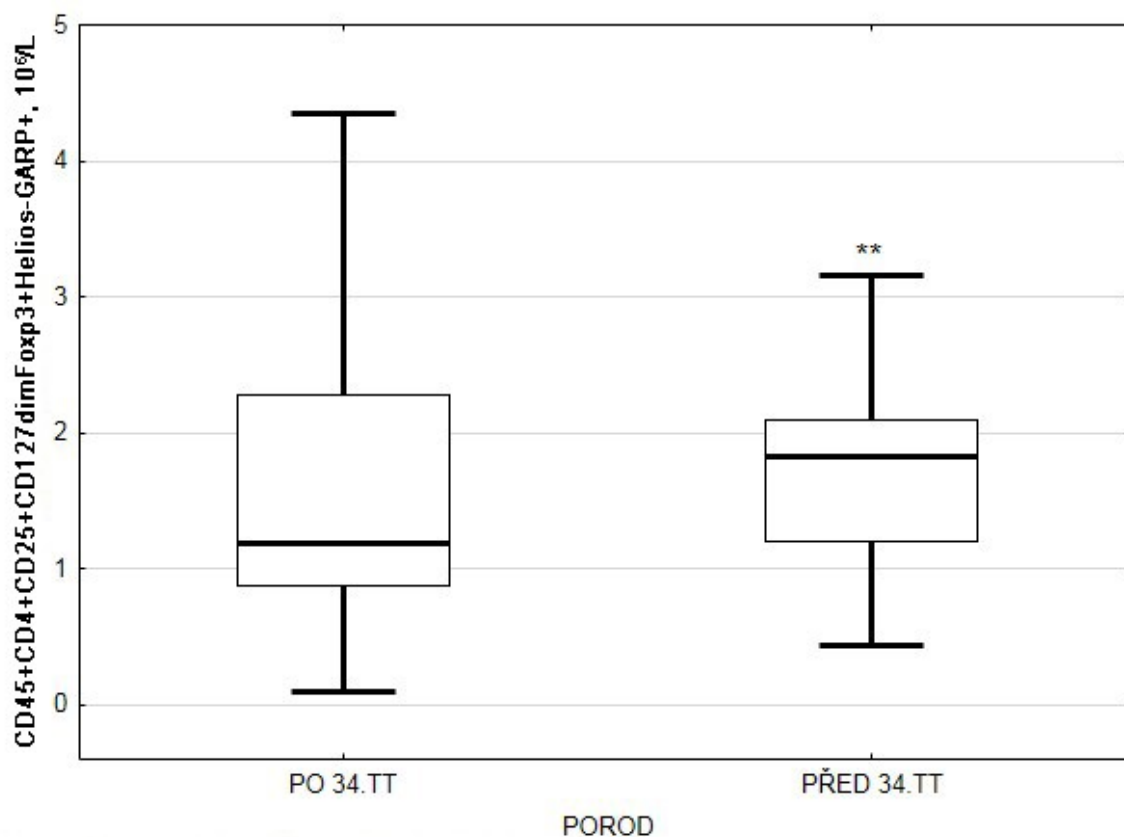
Při podrobné analýze subpopulací Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ a expresí, popř. bez exprese transkripčního faktoru Helios, jsme došli ke zjištění, že u předčasně rodících žen jsou, ve srovnání s ženami s fyziologickým průběhem těhotenství, patrně nižší absolutní počty populace iTreg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$ ($p=0,0502$), viz Graf 9.



Graf 9 Absolutní počty T regulační lymfocyty s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$ ve skupině předčasně rodících žen

Ve skupině žen rodících před 34. týdnem těhotenství ($n=19$) je patrné nižší zastoupení této populace než je tomu ve skupině žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, které následně porodily po 34. týdnu těhotenství ($n=27$).

U populace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$, u které nebyla přítomna exprese transkripčního faktoru Helios, jsou patrné vyšší absolutní počty buněk s expresí znaku GARP, přítomného na aktivovaných Treg ve skupině předčasně rodících žen, oproti skupině těhotných žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, rodících po 34. týdnu těhotenství, ($p=0,0599$), viz Graf 10.

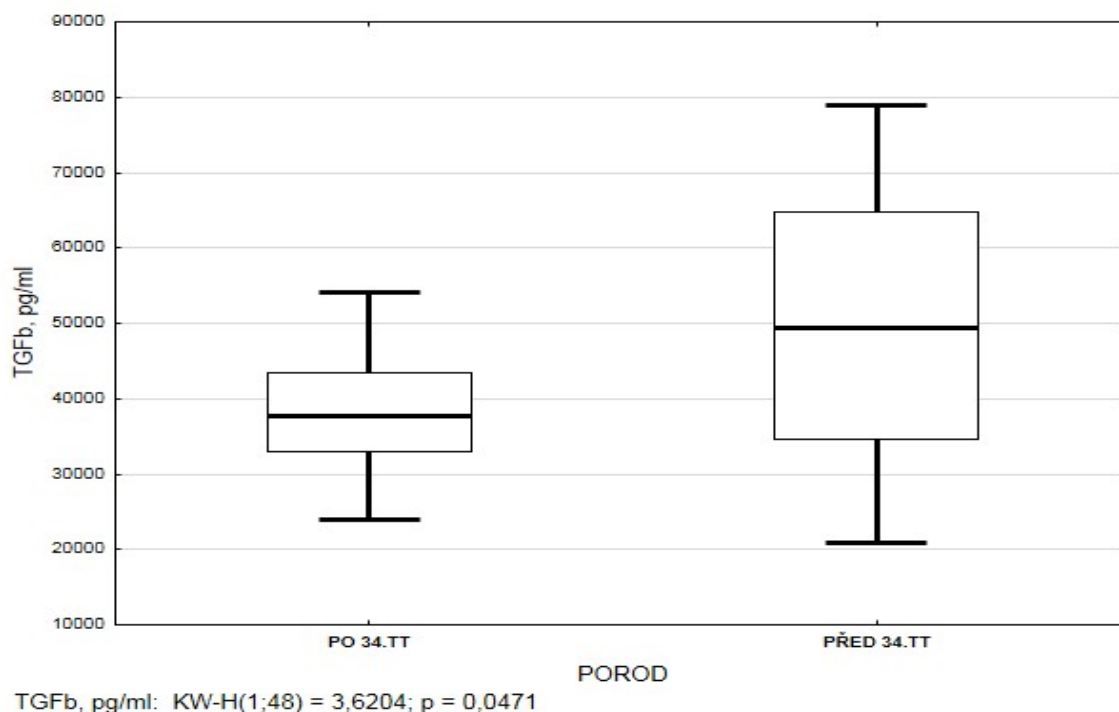


$CD45+CD4+CD25+CD127^{dim}Foxp3+Helios-GARP^+, 10^6/L$: KW-H(1;49) = 0,804; $p = 0,0599$

Graf 10 Absolutní počty T regulační lymfocyty s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-GARP^+$ ve skupině předčasně rodících žen.

Ve skupině žen rodících před 34. týdnem těhotenství ($n=19$) je vyšší zastoupení této populace než u žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, které následně porodily po 34. týdnu těhotenství ($n=27$).

Sérové koncentrace cytokinu TGF- β 1 byly vyšší ve skupině předčasně rodících žen, oproti skupině žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, rodících následně po 34. týdnu těhotenství, ($p=0,0471$), viz Graf 11.



Graf 11 Sérová koncentrace TGF- β 1 ve skupině předčasně rodících žen.

Ve skupině předčasně rodících žen ($n=19$) je v porovnání se skupinou zdravých těhotných žen v odpovídajícím týdnu těhotenství, které následně rodily po 34.týdnu těhotenství ($n=27$) vyšší sérová koncentrace cytokinu TGF- β 1.

TGF β – TGF- β 1 - Transforming growth factor β .

9 Diskuze

Základní podmínkou vzniku a úspěšného průběhu těhotenství je fetomaternální tolerance. Lze jí definovat jako absenci mateřské cytotoxické imunitní odpovědi na semialogenní plod. Mechanizmy zajištění fetomaternální tolerance jsou různorodé a do značné míry redundantní. Rozsáhlá komunikace mezi trofoblastem, mateřskou imunitou a mikrobiomem matky, tzv. fetomaternální imunitní cross-talk, začíná již v samotných počátcích gravidity. Účastní se jej buňky monocyto-makrofágového systému, dendritické buňky, NK buňky, CD8⁺ cytotoxické T lymfocyty a v neposlední řadě též pomocné CD4⁺ T lymfocyty, a to především subpopulace T regulačních lymfocytů. Neadekvátní fetomaternální cross-talk může být příčinou potratu, předčasného porodu a důkazy existují již i pro mechanismy vzniku preeklampsie. Výzkumy hledají možné asociace též s nitroděložní růstovou retardací plodu a/nebo s abrupcemi placenty.

V klinické praxi sílí tlak na objev nových biomarkerů schopných predikovat uvedené těhotenské komplikace, s cílem zlepšit terapeutické postupy vedoucí k co nejmenším ztrátám na straně plodu i matky. To vše jde ruku v ruce s detailnějším studiem změn a kooperace tělních systému v průběhu těhotenství, včetně fungování a vlivu imunitního systému na jeho průběh.

Předkládaná práce vyšla z předpokladu, že se na fetomaternální toleranci podílí zejména populace Treg a tolerogenní cytokinové prostředí tvořené zejména TGF- β (La Rocca et al. 2014). Jsou známy četné studie popisující snížené zastoupení populace Treg u některých sledovaných těhotenských komplikací, jako například předčasný spontánní porod před 34. týdnem těhotenství (Koucký et al. 2014), nitroděložní růstová retardace plodu (Mukhopadhyay et al. 2014) nebo preeklampsie (Toldi et al. 2015). Cílem práce byl popis dynamiky výskytu a fenotypu jednotlivých subpopulací Treg v průběhu fyziologického a patologického těhotenství. Díky moderním metodám mnohobarevné průtokové cytometrie byl sestaven panel funkčních i maturačních znaků populace Treg, která byla takto rozčleněna na jednotlivé subpopulace.

První sledovanou populací byla populace Treg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$, kterou dále označujeme již jako populaci Treg, která je považována za populaci s regulačními a reparačními vlastnostmi (Sakaguchi et al. 2002). Takto fenotypově značená populace nebyla zatím v průběhu těhotenství sledována. Zastoupení této populace bylo mezi 6. až 35. týdnem těhotenství konstantní. V období porodu zastoupení této populace klesá. Obdobný trend měla i dynamika tvorby populace Treg s expresí transkripčního faktoru Helios. Tato buněčná subpopulace má svůj původ v thymu. Existuje studie, která se zabývá vlivem $Helios^+$ a $Helios^-$ Treg na navození tolerance, resp. poruchu fetomaternální tolerance s indukci těhotenských komplikací, ze které vyplývá, že zásadní pro navození tolerance je spíše subpopulace iTreg (Hsu et al. 2012). V předkládané studii bylo prokázáno, že ve skupině zdravých těhotných žen populace Treg $Helios^+$ na rozdíl Treg $Helios^-$ mění svou dynamiku: k maximální četnosti $Helios^+$ Treg populace dochází v období mezi 30. až 35. týdnem těhotenství, během období porodu počty $Helios^+$ Treg rapidně klesají.

K signifikantním změnám dochází u subpopulací Treg s expresí inhibiční molekuly PD-1. Dynamika populace Treg s expresí inhibičního znaku PD-1 v průběhu fyziologického těhotenství nebyla doposud popsána. Mechanismus fungování Treg s expresí PD-1 je důležitý např. při potlačení chronické rejekce alogenního transplantátu (Tanaka et al. 2007) a podobný mechanismu funguje pravděpodobně také při ochraně semialogenního plodu. Předpokládá se, že tato populace se také podílí na navození fetomaternální tolerance, je však důležité říci, že studie o významu exprese PD-1 pro navození fetomaternální tolerance byla prováděna na myších modelech (Guleria et al. 2005). Naše výsledky ukazují, že ke kulminaci počtu PD-1 pozitivních Treg dochází mezi 20. až 25. týdnem gravidity. Následně dochází k poklesu jejich počtů, přičemž nejméně PD-1 pozitivních Treg se v periferní krvi nachází během porodu. Obdobný trend vykazovala dynamika počtů populace $Helios^+PD-1^+$ Treg. U populace $Helios^-PD-1^+$ Treg je patrné maximální zastoupení v období mezi 6. až 12. týdnem těhotenství, následně jejich zastoupení v periferní krvi klesá. Mohlo by se tedy jednat o populaci, která se podílí na navození fetomaternální tolerance v časných fázích těhotenství. V pozdějších fázích těhotenství by tuto funkci mohla převzít populace nTreg s expresí znaku PD-1.

$CD45RA^+$ Treg jsou populací naivních Treg. Vyšší zastoupení $CD45RA^+$ pozitivní populace je popisováno zejména v dětství, v pozdějších obdobích života převládá populace $CD45RA^-$,

resp. populace $CD45RO^+$ (Booth et al. 2010). V jednotlivých stádiích těhotenství koreluje dynamika četnosti této populace s trendem dynamiky tvorby s populacemi Treg a $Treg^+Helios^+$. Nízké zastoupení populace $Treg^+CD45RA^+$, byl popsán ve studii, která se zabývala sledováním této populace u pacientek s diagnózou PE (Steinborn et al. 2012).

Expresí znaku GARP je typická pro aktivovanou subpopulaci Treg. Jeho základní funkcí je vazba latentního komplexu $LAP^+TGF-\beta$ (Tran et al. 2009). Dynamika četností GARP pozitivní populace Treg nebyla v průběhu těhotenství zatím sledována. Neobjevují se ani práce popisující souvislost změn v zastoupení této populace s žádnými těhotenskými komplikacemi. Jejich studium je zatím spojováno zejména ve spojitosti s protinádorovou terapií (Sun, Jin, and Li 2016b). Při analýze absolutních počtů subpopulací $GARP^+$ Treg bylo zjištěno, že četnost této populace je v průběhu fyziologicky probíhajícího těhotenství konstantní. Ve skupině předčasně rodících žen je patrný nárůst četnosti buněčné subpopulace $Treg^+Helios^-GARP^+$. To koresponduje s faktem, že pro expresi GARP je důležitá stimulace přes TCR, značící pro přítomnost zánětlivých změn. Zvýšená exprese GARP snižuje schopnost proliferace Treg (Zhou et al. 2013), což potvrzují i naše výsledky ve skupině předčasně rodících žen. Tyto ženy měly snížené zastoupení populace Treg, ovšem zastoupení populace $Helios^-GARP^+$ byla v porovnání se skupinou zdravých těhotných žen zvýšená.

Sérová koncentrace $TGF-\beta 1$ a zastoupení Treg mají v průběhu fyziologických těhotenství obdobnou dynamiku tvorby. To by mohlo potvrzovat vliv indukce tvorby populace T regulačních lymfocytů v cytokinovém prostředí tvořeném zejména $TGF-\beta$ a IL-2 (Fu et al. 2004). Pochopitelně nebyla prokázána žádná matematicky definovatelná pozitivní korelace, ale vývojové grafy obou parametrů byly velmi podobné. Překvapivým zjištěním bylo, že tento fakt neplatí ve skupině žen spontánně předčasně rodících. V sérech předčasně rodících žen byly koncentrace $TGF-\beta 1$ vysoké přes jednoznačně nižší zastoupení $CD4^+CD45^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ populace Treg. Jedno z možných vysvětlení této skutečnosti by mohl být přítomný zánětlivý proces asociovaný s populací Th17, jejichž diferenciace je také závislá na expresi $TGF-\beta 1$. Roli může hrát i zvýšená exprese aktivačního znaku GARP, jehož funkční charakter je ovlivněn cytokinovým prostředím. Zatímco populace Treg s expresí GARP v cytokinovém prostředí $TGF-\beta$ a IL-6 výrazně indukuje diferenciaci populace Th17, v cytokinovém prostředí tvořeném zejména IL-2 dochází k diferenciaci populace Treg (Edwards et al. 2013). Sledování sérových koncentrací IL-6 nebylo však cílem

našeho projektu, výše popsaný předpoklad nemůžeme potvrdit. Byla také popsána závislost mezi zvýšenou expresí GARP a TGF- β (Metelli et al. 2016), která měla v naší studii obdobný trend. Vhodným biomarkerem předčasného porodu, jehož sledování by se mohlo stát cílem dalšího sledování, je populace Treg s expresí GARP a popis cytokinového prostředí zejména hladin IL-2, TGF- β a IL-6.

Ve skupině zdravých těhotných žen bylo po 30. týdnu těhotenství diagnostikována u třech žen PE. Ačkoliv je tato skupina z pohledu statistického zhodnocení nevýznamná, zařadili jsem ji do výsledné analýzy dat. Nezaznamenali jsme však žádné rozdíly ve sledovaných populacích ani v hladinách sérové koncentrace TGF- β 1 u této minoritní skupiny sledovaných žen.

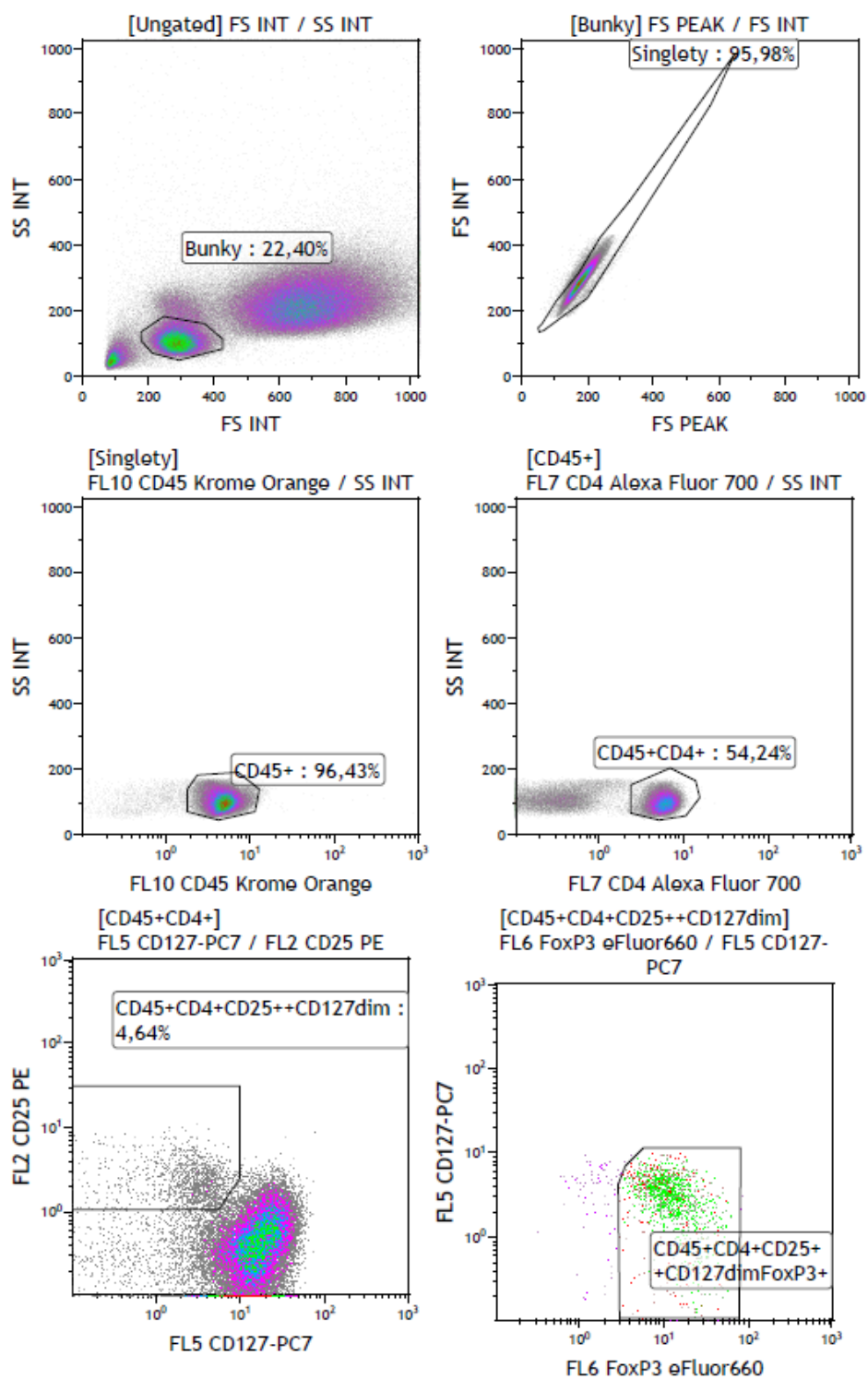
Posledním cílem bylo porovnání absolutních hodnot Treg značených pouze povrchovým značením (CD45,CD4,CD25,CD127), lépe využitelným v rutinní klinické laboratoři, s populací Treg s fenotypem CD45⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{dim}Foxp3⁺. Absolutní počty obou populací vykazovaly velmi těsnou korelaci. Tento výsledek poukazuje na možnost identifikace pouze na základě povrchové značení.

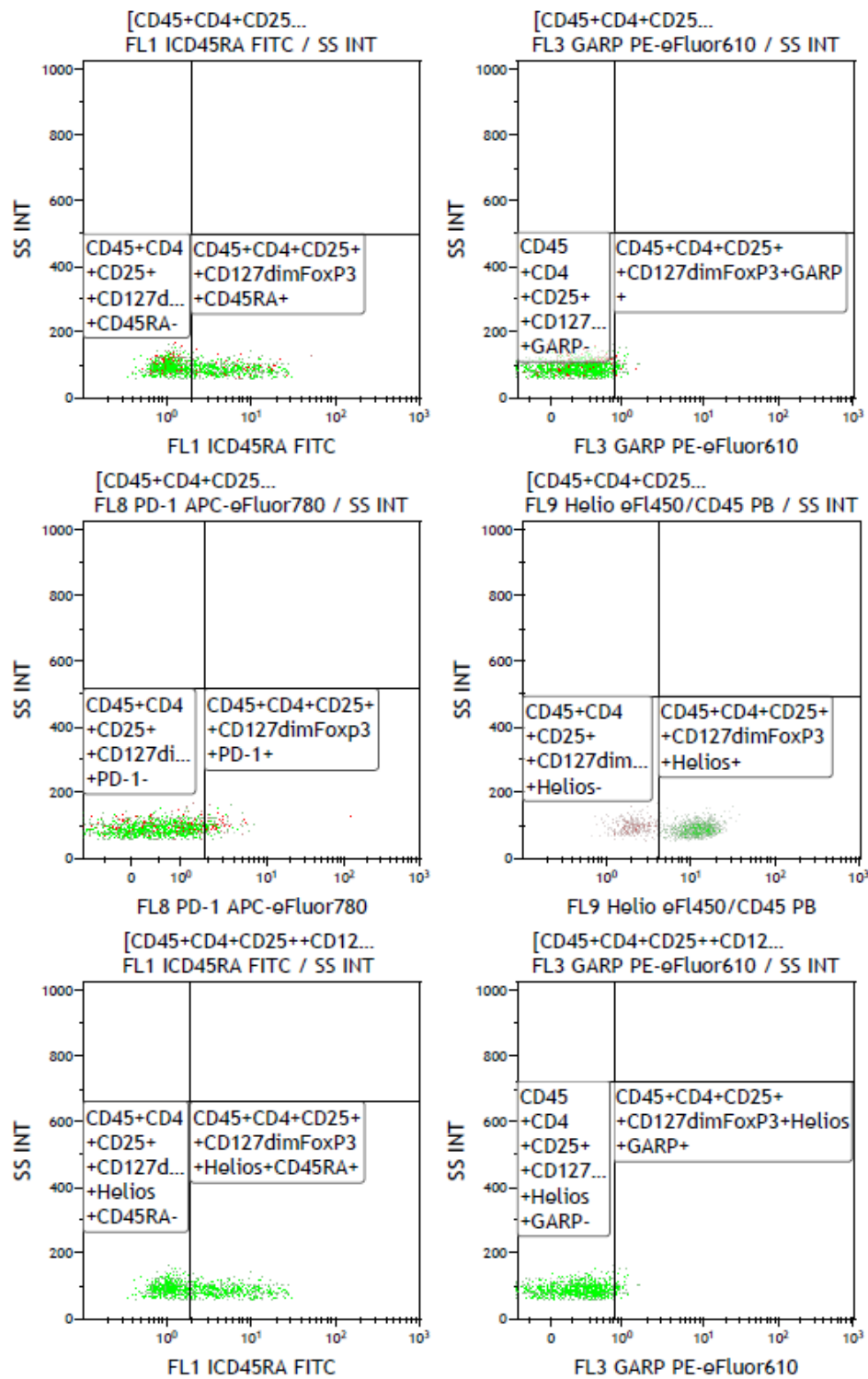
10 Závěr

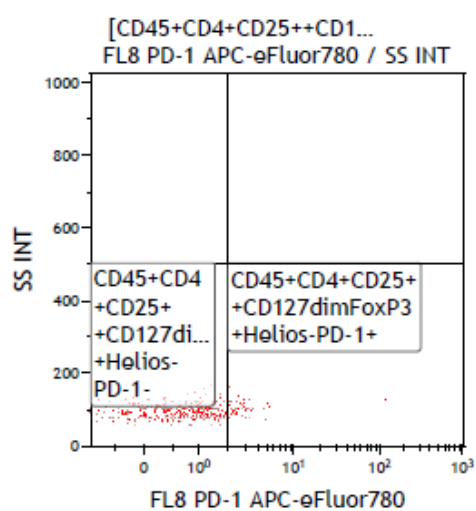
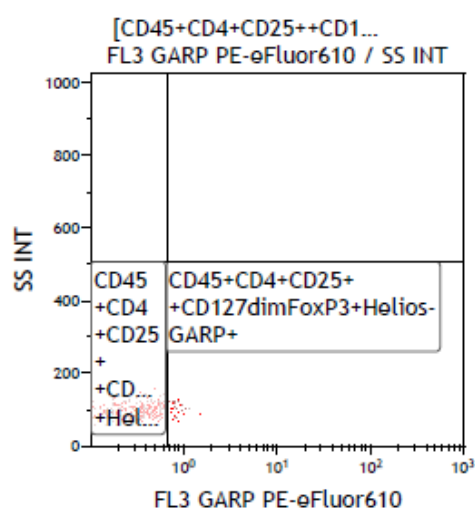
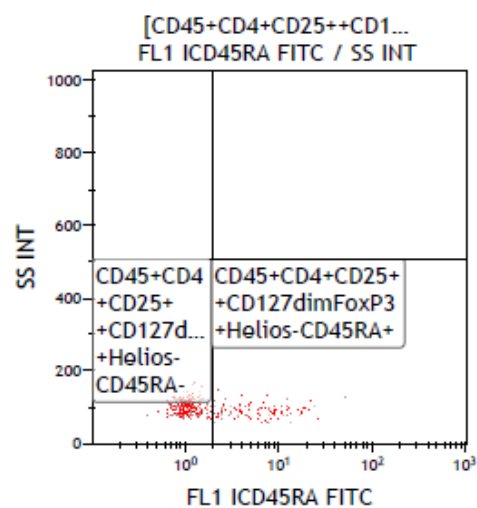
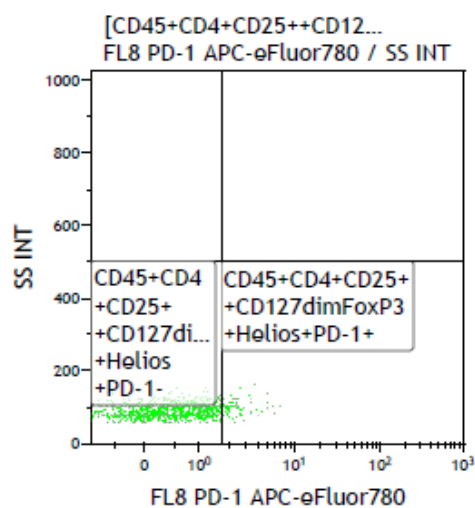
- Trend změny dynamiky tvorby v průběhu těhotenství byl prokázán u populací T regulačních lymfocytů $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$ a jejich subpopulací $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^+$, $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+PD-1$, $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^+$ a $Helios^-$ s expresí $PD-1^+$ nebo subpopulace $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$. U ostatních subpopulací nedošlo v průběhu těhotenství k signifikantním trendům změny dynamiky tvorby.
- Ve skupině žen předčasně rodících došlo k nižšímu zastoupení populace T regulačních lymfocytů a subpopulací s expresí CD45RA. Zastoupení subpopulace iTreg s expresí GARP bylo ve skupině předčasně rodících žen zvýšené.
- Hladina TGF- β 1 má u zdravých těhotných žen obdobný trend dynamiky tvorby jako populace T regulačních lymfocytů. U žen předčasně rodících dochází i přes snížené zastoupení T regulačních lymfocytů k vyšším hladinám TGF- β 1.
- Jako vhodná cílová subpopulace, která by se mohla stát cílem dalšího výzkumu při hledání vhodného biomarkeru předčasného porodu, se zdá být populace T regulačních lymfocytů exprimujících GARP a monitoring cytokinového prostředí, zejména TGF- β , IL-6 a IL-2.
- Při korelaci populací T regulačních lymfocytů značených pouze povrchovým značením (CD45,CD4,CD25,CD127) jsme zjistili úzkou korelaci s populací T regulačních lymfocytů s fenotypem $CD4^+CD45^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$. To naznačuje možnost využití pouze povrchového značení, lépe použitelného v klinické rutinní praxi.

11 Dodatek

Gatovací strategie použitá v experimentu







12 Obrazové přílohy

Obrázek 1 Zastoupení jednotlivých populací imunokompetentních buněk v endometriu v jednotlivých fázích menstruačního cyklu.

Obrázek 2 Vliv imunitního systému při nastolení fetomaternálního rozhraní v místě implantace embrya a remodelace spirálních tepen.

Obrázek 3 Schéma hormonálních vlivů a působení chemotaxe na migraci a diferenciaci populace T regulačních lymfocytů.

Obrázek 4 Předpokládaný vzorec navození fetomaternální tolerance zprostředkované populací T regulačních lymfocytů.

Obrázek 5 Fáze těhotenství a polarizace populací pomocných lymfocytů.

Obrázek 6 Časová osa popisující objev regulačních T lymfocytů a jejich fenotypu u lidí a myší.

Obrázek 7 Schéma mechanismu regulace zprostředkované T regulačními lymfocyty.

Obrázek 8 Receptor pro Interleukin 2 na T regulačních lymfocytech.

Obrázek 9 Schéma znázorňující funkci GARP a jeho kooperace s TGF- β .

Obrázek 10 Závislost exprese CD45RA a Foxp3 na různých aktivačních stádiích populací T regulačních lymfocytů.

Obrázek 11 Ředění kalibrační křivky použité při vyhodnocení výsledných hodnot TGF- β 1 metodou ELISA.

13 Tabulkové přílohy

Tabulka 1 *Populace Th1/Th2/Th17 a Treg ve fyziologickém a patologickém těhotenství v periferní krvi a děloze.*

Tabulka 2 *Fenotypové markery regulačních T lymfocytů.*

Tabulka 3 *Využití jednotlivých kanálů průtokového cytometru, sledované parametry, jejich značení a výrobce monoklonálních protilátek.*

Tabulka 4 *Výsledné ředění jednotlivých monoklonálních protilátek použitých v experimentu.*

Tabulka 5 *Gatovací strategie použita v experimentu.*

Tabulka 6 *Tendence tvorby subpopulací T regulačních lymfocytů v průběhu těhotenství.*

14 Seznam grafů

Graf 1 *Korelace absolutních počtů T regulačních lymfocytů fenotypu $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}$ s populací $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+$*

Graf 2 *Sérové hladiny TGF- β 1 v pg na ml v průběhu těhotenství.*

Graf 3 *Zastoupení populace T regulačních lymfocytů v průběhu těhotenství.*

Graf 4 *Zastoupení T regulačních lymfocytů s expresí transkripčního faktoru Helios v průběhu těhotenství v periferní krvi.*

Graf 5 *Dynamika tvorby populace T regulačních lymfocytů s expresí inhibičního znaku PD1 u subpopulací nTreg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^+PD1^+$ a iTreg s fenotypem $CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-PD1^+$ v průběhu fyziologického těhotenství.*

Graf 6 Dynamika tvorby populace T regulačních lymfocytů bez exprese transkripčního faktoru Helios s expresí znaku CD4RA v průběhu fyziologického těhotenství .

Graf 7 Absolutní počty populace T regulačních lymfocytů ve skupině předčasně rodících žen

Graf 8 Absolutní počty T regulačních lymfocytů s fenotypem

$CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+CD45RA^+$ u předčasně rodících žen.

Graf 9 Absolutní počty T regulační lymfocyty s fenotypem

$CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-CD45RA^+$ ve skupině předčasně rodících žen.

Graf 10 Absolutní počty T regulační lymfocyty s fenotypem

$CD45^+CD4^+CD25^+CD127^{dim}Foxp3^+Helios^-GARP^+$ ve skupině předčasně rodících žen.

Graf 11 Sérová koncentrace TGF- β 1 ve skupině předčasně rodících žen.

15 Literatura

- Akdis, Cezmi A., and Kurt Blaser. 2001. "Mechanisms of Interleukin-10-Mediated Immune Suppression." *Immunology* 103(2): 131–36.
- Balandya, Emmanuel, Wendy Wieland-Alter, Katherine Sanders, and Timothy Lahey. 2012. "Human Seminal Plasma Fosters CD4(+) Regulatory T-Cell Phenotype and Transforming Growth Factor- β 1 Expression." *American journal of reproductive immunology (New York, N.Y. : 1989)* 68(4): 322–30.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3440550&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Baldwin, Troy A, and Hanne L Ostergaard. 2000. "Specific Isoforms of the Resident Endoplasmic Reticulum Protein Glucosidase II Associate with the CD45 Protein-Tyrosine Phosphatase via a Lectin-like Interaction *." 275(41): 32071–76.
- Bao, Rui et al. 2016. "Adenosine Promotes Foxp3 Expression in Treg Cells in Sepsis Model by Activating JNK/AP-1 Pathway." *American Journal of Translational Research* 8(5): 2284–92.
- Berbic, Marina, and Ian S Fraser. 2013. "Immunology of Normal and Abnormal Menstruation." *Women's health (London, England)* 9(4): 387–95.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23826779>.
- Booth, Nicola J et al. 2010. "Different Proliferative Potential and Migratory Characteristics of Human CD4+ Regulatory T Cells That Express Either CD45RA or CD45RO." *J Immunol* 184(8): 4317–26. <http://www.jimmunol.org/cgi/content/abstract/184/8/4317>.
- Bopp, Tobias et al. 2007. "Cyclic Adenosine Monophosphate Is a Key Component of Regulatory T Cell – Mediated Suppression." 204(6): 1303–10.
- Boyman, Onur, and Jonathan Sprent. 2012. "The Role of Interleukin - 2 during Homeostasis and Activation of the Immune System." *Nature Publishing Group* 12(3): 180–90.
<http://dx.doi.org/10.1038/nri3156>.
- Brown, Michael P et al. 2013. "Cross-Presentation of Male Seminal Fluid Antigens Elicits T Cell Activation to Initiate the Female Immune Response."
- Chaouat, Gérard et al. 2003. "Cytokines, Implantation and Early Abortion: Re-Examining the Th1/Th2 Paradigm Leads to Question the Single Pathway, Single Therapy Concept." *American Journal of Reproductive Immunology* 50: 177–86.
- Clark, David A. 2016. "The Importance of Being a Regulatory T Cell in Pregnancy." *Journal of Reproductive Immunology* 116: 60–69.
- Dekel, Nava et al. 2014. "The Role of Inflammation for a Successful Implantation." *American Journal of Reproductive Immunology* 72(2): 141–47.
- Edwards, JP et al. 2013. "Regulation of the Expression of GARP/latent-TGF- β 1 Complexes on Mouse T Cells and Their Role in Regulatory T Cell and Th17 Differentiation." *Journal of Immunology* 18(9): 1199–1216.
- Eriksson, Mikael, Sarah K Meadows, Charles R Wira, and Charles L Sentman. 2006. "Endogenous Transforming Growth Factor- B Inhibits Toll-Like Receptor Mediated Activation of Human Uterine Natural Killer Cells."
- Ferreira, Leonardo M R, Torsten B Meissner, Tamara Tilburgs, and Jack L Strominger. 2017. "HLA-G : At the Interface of Maternal – Fetal Tolerance." *Trends in Immunology* 38(4): 272–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.01.009>.
- Fu, Shuang et al. 2004. "TGF- β Induces Foxp3 + T-Regulatory Cells from CD4 + CD25 -

- Precursors." *American Journal of Transplantation* 4(10): 1614–27.
- Gambineri, Eleonora et al. 2008. "Clinical and Molecular Profile of a New Series of Patients with Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome: Inconsistent Correlation between Forkhead Box Protein 3 Expression and Disease Severity." *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 122(6): 1105–13.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2008.09.027>.
- Gaur, Poonam, Avadhesh Kumar Singh, Nootan K. Shukla, and Satya N. Das. 2014. "Inter-Relation of Th1, Th2, Th17 and Treg Cytokines in Oral Cancer Patients and Their Clinical Significance." *Human Immunology* 75(4): 330–37.
- Gibson, D. A., E. Greaves, H. O D Critchley, and P. T K Saunders. 2015. "Estrogen-Dependent Regulation of Human Uterine Natural Killer Cells Promotes Vascular Remodelling via Secretion of CCL2." *Human Reproduction* 30(6): 1290–1301.
- Girardi, G et al. 2006. "Complement Activation Induces Dysregulation of Angiogenic Factors and Causes Fetal Rejection and Growth Restriction." *J Exp Med* 203(9): 2165–75.
- Guleria, Indira et al. 2005. "A Critical Role for the Programmed Death Ligand 1 in Fetomaternal Tolerance." *The Journal of experimental medicine* 202(2): 231–37.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2213002&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gustafsson, Charlotte et al. 2008. "Gene Expression Profiling of Human Decidual Macrophages: Evidence for Immunosuppressive Phenotype." *PLoS ONE* 3(4): 1–10.
- Haribhai, Dipica et al. 2011. "A Requisite Role for Induced Regulatory T Cells in Tolerance Based on Expanding Antigen Receptor Diversity." *Immunity* 35(1): 109–22.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2011.03.029>.
- Houser, Brandy L. 2012. "Decidual Macrophages and Their Roles at the Maternal-Fetal Interface." *Yale Journal of Biology and Medicine* 85(1): 105–18.
- Hsu, Peter et al. 2012. "Altered Decidual DC-SIGN+ Antigen-Presenting Cells and Impaired Regulatory T-Cell Induction in Preeclampsia." *American Journal of Pathology* 181(6): 2149–60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.032>.
- King, A. et al. 2000. "Surface Expression of HLA-C Antigen by Human Extravillous Trophoblast." *Placenta* 21(4): 376–87.
- Koucký, Michal et al. 2014. "Low Levels of Circulating T-Regulatory Lymphocytes and Short Cervical Length Are Associated with Preterm Labor." *Journal of Reproductive Immunology* 106: 110–17.
- Lash, G E, S C Robson, and J N Bulmer. 2010. "Review : Functional Role of Uterine Natural Killer (uNK) Cells in Human Early Pregnancy Decidua." *Placenta* 31: S87–92.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.placenta.2009.12.022>.
- Li, Xinyuan et al. 2012. "IL-35 Is a Novel Responsive Anti-Inflammatory Cytokine — A New System of Categorizing Anti-Inflammatory Cytokines." 7(3).
- Lorenz, Tierney K., Julia R. Heiman, and Gregory E. Demas. 2015. "Sexual Activity Modulates Shifts in TH1/TH2 Cytokine Profile across the Menstrual Cycle: An Observational Study." *Fertility and Sterility* 104(6): 1513–1521.e4.
- Mattci, Marie-genevieve, Pierre Golstein, and Marie-paule Lefranc. 1988. "Human Ig Superfamily CTLA-4 Gene : Chromosomal Localization and Identity of Protein Sequence between Murine and Human CTLA-4 Cytoplasmic Domains *." : 1901–5.
- Meng, Xiao et al. 2015. "Regulatory T Cells in Cardiovascular." *Nature Publishing Group* 13(3): 167–79. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2015.169>.
- Metelli, A. et al. 2016. "Surface Expression of TGF Docking Receptor GARP Promotes

- Oncogenesis and Immune Tolerance in Breast Cancer." *Cancer Research*: 1–12.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27913437>5Cn<http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-1456>.
- Miyara, Makoto, and Shimon Sakaguchi. 2007. "Natural Regulatory T Cells : Mechanisms of Suppression." 13(3).
- Mor, Gil, Ingrid Cardenas, Vikki Abrahams, and Seth Guller. 2011. "Inflammation and Pregnancy: The Role of the Immune System at the Implantation Site." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1221(1): 80–87.
- Mukhopadhyay, Dhriti et al. 2014. "Intrauterine Growth Restriction and Prematurity Influence Regulatory T Cell Development in Newborns." In *Journal of Pediatric Surgery*, , 727–32.
- Mun, Raquel, Enrique Garcı, Ester Leno-dura, and Irene Tirado-gonza. 2014. "Liaison between Natural Killer Cells and Dendritic Cells in Human Gestation." (April): 449–55.
- Ning, Fen, Huishu Liu, and Gendie E Lash. 2016. "The Role of Decidual Macrophages During Normal and Pathological Pregnancy." 75: 298–309.
- Probst-Kepper, M. et al. 2009. "GARP: A Key Receptor Controlling FOXP3 in Human Regulatory T Cells." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 13(9 B): 3343–57.
- Robertson, Sarah A. 2005. "Seminal Plasma and Male Factor Signalling in the Female Reproductive Tract." *Cell and Tissue Research* 322(1): 43–52.
- Robertson, Sarah A., Jelmer R. Prins, David J. Sharkey, and Lachlan M. Moldenhauer. 2013. "Seminal Fluid and the Generation of Regulatory T Cells for Embryo Implantation." *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 315–30.
- Robertson, Sarah A, and David J Sharkey. 2016. "Seminal Fluid and Fertility in Women." *Fertility and sterility* 106(3): 511–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27485480>.
- La Rocca, Claudia, Fortunata Carbone, Salvatore Longobardi, and Giuseppe Matarese. 2014. "The Immunology of Pregnancy: Regulatory T Cells Control Maternal Immune Tolerance toward the Fetus." *Immunology Letters* 162(1): 41–48.
- Saito, Shigeru, Akitoshi Nakashima, Mika Ito, and Tomoko Shima. 2011. "Clinical Implication of Recent Advances in Our Understanding of IL-17 and Reproductive Immunology." : 649–57.
- Saito, Shigeru, Akitoshi Nakashima, Tomoko Shima, and Mika Ito. 2010. "Th1/Th2/Th17 and Regulatory T-Cell Paradigm in Pregnancy." *American Journal of Reproductive Immunology* 63(6): 601–10.
- Saito, Shigeru, Tomoko Shima, Kumiko Inada, and Akitoshi Nakashima. 2013a. "Which Types of Regulatory T Cells Play Important Roles in Implantation and Pregnancy Maintenance?" *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 340–45.
- Saito. 2013b. "Which Types of Regulatory T Cells Play Important Roles in Implantation and Pregnancy Maintenance?" *American Journal of Reproductive Immunology* 69(4): 340–45.
- Sakaguchi, Shimon, Makoto Miyara, Cristina M Costantino, and David A Hafler. 2010. "FOXP3+ Regulatory T Cells in the Human Immune System." *Nature Publishing Group* 10(7): 490–500. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2785>.
- Sakaguchi, Shimon, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura, and Masahiro Ono. 2008. "Review Regulatory T Cells and Immune Tolerance." : 775–87.
- Santner-Nanan, Brigitte et al. 2009. "Systemic Increase in the Ratio between Foxp3+ and IL-17-Producing CD4+ T Cells in Healthy Pregnancy but Not in Preeclampsia." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 183(11): 7023–30.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915051>.
- Schumacher, Anne, and Ana Claudia Zenclussen. 2014. "Regulatory T Cells: Regulators of Life." *American Journal of Reproductive Immunology* 72(2): 158–70.
- Sheppard, Kelly-ann et al. 2004. "PD-1 Inhibits T-Cell Receptor Induced Phosphorylation of the ZAP70 / CD3 F Signalingosome and Downstream Signaling to PKC η ." 574: 37–41.
- Shohei Hori, Takashi Nomura, Shimon Sakaguchi. 2002. "Control of Regulatory T Cell Development by the Transcription Factor Foxp3." *Science* 299(2003): 1057–61.
- Sojka, Dorothy K., Angela Hughson, and Deborah J. Fowell. 2009. "CTLA-4 Is Required by CD4⁺CD25⁺ Treg to Control CD4⁺ T-Cell Lymphopenia-Induced Proliferation." *European Journal of Immunology* 39(6): 1544–51.
- Starkey, P M, L M Clover, and M C Rees. 1991. "Variation during the Menstrual Cycle of Immune Cell Populations in Human Endometrium." *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 39(3): 203–7.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709605>.
- Steinborn, A. et al. 2012. "Pregnancy-Associated Diseases Are Characterized by the Composition of the Systemic Regulatory T Cell (T Reg) Pool with Distinct Subsets of T Regs." *Clinical and Experimental Immunology* 167(1): 84–98.
- Sun, Liping, Hao Jin, and Hui Li. 2016a. "GARP : A Surface Molecule of Regulatory T Cells That Is Involved in the Regulatory Function and TGF- β Releasing."
- Sun, Liping, Hao Jin, and Hui Li. 2016b. "GARP : A Surface Molecule of Regulatory T Cells That Is Involved in the Regulatory Function and TGF- β Releasing." 7(27).
- Svensson-Arvelund, Judit et al. 2014. "The Placenta in Toxicology. Part II: Systemic and Local Immune Adaptations in Pregnancy." *Toxicologic pathology* 42(2): 327–38.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23531796>.
- Szekeres-Bartho, Julia, Udo R. Markert, and Marigoula Varla-Leftherioti. 2015. "Immunology in Reproduction." *Journal of Reproductive Immunology* 108: 1.
- Tanaka, Katsunori et al. 2007. "PDL1 Is Required for Peripheral Transplantation Tolerance and Protection from Chronic Allograft Rejection." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179(8): 5204–10.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17911605>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2291549>.
- Thornton, Angela M et al. "Expression of Helios, an Ikaros Transcription Factor Family Member, Differentiates Thymic-Derived from Peripherally Induced Foxp3⁺ T Regulatory Cells."
- Toldi, Gergely et al. 2015. "Prevalence of Regulatory T-Cell Subtypes in Preeclampsia." *American Journal of Reproductive Immunology* 74(2): 110–15.
- Tran, Dat Q et al. 2009. "GARP (LRRC32) Is Essential for the Surface Expression of Latent TGF- β on Platelets and Activated FOXP3⁺ Regulatory T Cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(32): 13445–50.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651619>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2726354>.
- Wang, Yingying et al. 2010. "Past, Present and Future Applications of Flow Cytometry in Aquatic Microbiology." *Trends in Biotechnology* 28(8): 416–24.
- Wegmann, Thomas G., Hui Lin, Larry Guilbert, and Tim R. Mosmann. 1993. "Bidirectional Cytokine Interactions in the Maternal-Fetal Relationship: Is Successful Pregnancy a TH2 Phenomenon?" *Immunology Today* 14(7): 353–56.
- Wira, Charles R. et al. 2010. "Sex Hormone Regulation of Innate Immunity in the Female

Reproductive Tract: The Role of Epithelial Cells in Balancing Reproductive Potential with Protection against Sexually Transmitted Pathogens.” *American Journal of Reproductive Immunology* 63(6): 544–65.

Zhou, Angela X, Lina Kozhaya, Hodaka Fujii, and Derya Unutmaz. 2013. “GARP-TGF- β Complexes Negatively Regulate Regulatory T Cell Development and Maintenance of Peripheral CD4⁺ T Cells in Vivo.” *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 190(10): 5057–64.
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3653571&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.